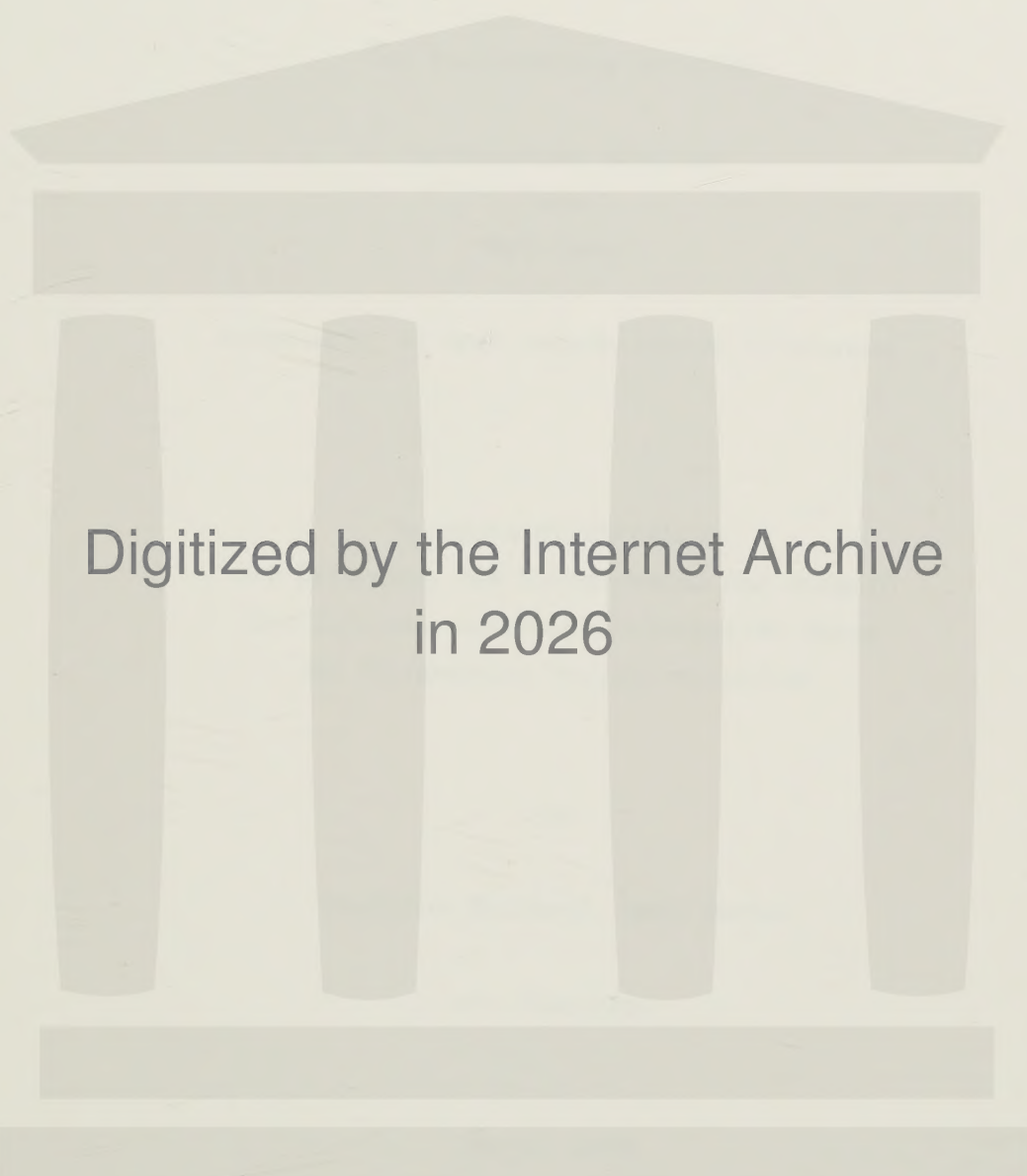


Reichert-Becker, Dorothea

Disbui. QU Mainz

1990



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554422_0034

Aus dem Institut für physiologische Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Der Zusammenhang zwischen

"alkalischer Elution"

und

"MFO-Test",

untersucht an drei verschiedenen Substanzen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von

Dorothea Reichert, geb. Becker

aus Dinslaken

Mainz, 1990

Dekan: Prof. Dr. M. Thelen

1. Gutachter: Prof. Dr. R. K. Zahn

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Schmidt

Tag der Promotion: 23. Mai 1990

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite 1 - 2
2. Zusammenfassung	Seite 3 - 11
3. Hauptteil	Seite 12 - 15
3.1. Einführung	Seite 12 - 13
3.2. Hauptteil	Seite 14 - 15
3.3. Zusammenfassung	Seite 16 - 17
4. Ergebnisse	
4.1. Ergebnisse	Seite 18
4.2. Zusammenfassung der Ergebnisse	Seite 19 - 20
4.3. Zusammenfassung und die in 4.1.	Seite 21
5. Diskussion	
5.1. Ergebnisse	Seite 22
5.2. Zusammenfassung	Seite 23 - 24
5.3. Zusammenfassung	Seite 25 - 26
5.4. Zusammenfassung	Seite 27 - 28
5.5. Zusammenfassung	Seite 29 - 30
5.6. Zusammenfassung	Seite 31 - 32
5.7. Zusammenfassung	Seite 33 - 34
5.8. Zusammenfassung	Seite 35 - 36
5.9. Zusammenfassung	Seite 37 - 38
5.10. Zusammenfassung	Seite 39 - 40
5.11. Zusammenfassung	Seite 41 - 42
5.12. Zusammenfassung	Seite 43 - 44
5.13. Zusammenfassung	Seite 45 - 46
5.14. Zusammenfassung	Seite 47 - 48
5.15. Zusammenfassung	Seite 49 - 50
5.16. Zusammenfassung	Seite 51 - 52
5.17. Zusammenfassung	Seite 53 - 54
5.18. Zusammenfassung	Seite 55 - 56
5.19. Zusammenfassung	Seite 57 - 58
5.20. Zusammenfassung	Seite 59 - 60
5.21. Zusammenfassung	Seite 61 - 62
5.22. Zusammenfassung	Seite 63 - 64
5.23. Zusammenfassung	Seite 65 - 66
5.24. Zusammenfassung	Seite 67 - 68
5.25. Zusammenfassung	Seite 69 - 70
5.26. Zusammenfassung	Seite 71 - 72
5.27. Zusammenfassung	Seite 73 - 74
5.28. Zusammenfassung	Seite 75 - 76
5.29. Zusammenfassung	Seite 77 - 78
5.30. Zusammenfassung	Seite 79 - 80
5.31. Zusammenfassung	Seite 81 - 82
5.32. Zusammenfassung	Seite 83 - 84
5.33. Zusammenfassung	Seite 85 - 86
5.34. Zusammenfassung	Seite 87 - 88
5.35. Zusammenfassung	Seite 89 - 90
5.36. Zusammenfassung	Seite 91 - 92
5.37. Zusammenfassung	Seite 93 - 94
5.38. Zusammenfassung	Seite 95 - 96
5.39. Zusammenfassung	Seite 97 - 98
5.40. Zusammenfassung	Seite 99 - 100
5.41. Zusammenfassung	Seite 101 - 102
5.42. Zusammenfassung	Seite 103 - 104
5.43. Zusammenfassung	Seite 105 - 106
5.44. Zusammenfassung	Seite 107 - 108
5.45. Zusammenfassung	Seite 109 - 110
5.46. Zusammenfassung	Seite 111 - 112
5.47. Zusammenfassung	Seite 113 - 114
5.48. Zusammenfassung	Seite 115 - 116
5.49. Zusammenfassung	Seite 117 - 118
5.50. Zusammenfassung	Seite 119 - 120
5.51. Zusammenfassung	Seite 121 - 122
5.52. Zusammenfassung	Seite 123 - 124
5.53. Zusammenfassung	Seite 125 - 126
5.54. Zusammenfassung	Seite 127 - 128
5.55. Zusammenfassung	Seite 129 - 130
5.56. Zusammenfassung	Seite 131 - 132
5.57. Zusammenfassung	Seite 133 - 134
5.58. Zusammenfassung	Seite 135 - 136
5.59. Zusammenfassung	Seite 137 - 138
5.60. Zusammenfassung	Seite 139 - 140
5.61. Zusammenfassung	Seite 141 - 142
5.62. Zusammenfassung	Seite 143 - 144
5.63. Zusammenfassung	Seite 145 - 146
5.64. Zusammenfassung	Seite 147 - 148
5.65. Zusammenfassung	Seite 149 - 150
5.66. Zusammenfassung	Seite 151 - 152
5.67. Zusammenfassung	Seite 153 - 154
5.68. Zusammenfassung	Seite 155 - 156
5.69. Zusammenfassung	Seite 157 - 158
5.70. Zusammenfassung	Seite 159 - 160
5.71. Zusammenfassung	Seite 161 - 162
5.72. Zusammenfassung	Seite 163 - 164
5.73. Zusammenfassung	Seite 165 - 166
5.74. Zusammenfassung	Seite 167 - 168
5.75. Zusammenfassung	Seite 169 - 170
5.76. Zusammenfassung	Seite 171 - 172
5.77. Zusammenfassung	Seite 173 - 174
5.78. Zusammenfassung	Seite 175 - 176
5.79. Zusammenfassung	Seite 177 - 178
5.80. Zusammenfassung	Seite 179 - 180
5.81. Zusammenfassung	Seite 181 - 182
5.82. Zusammenfassung	Seite 183 - 184
5.83. Zusammenfassung	Seite 185 - 186
5.84. Zusammenfassung	Seite 187 - 188
5.85. Zusammenfassung	Seite 189 - 190
5.86. Zusammenfassung	Seite 191 - 192
5.87. Zusammenfassung	Seite 193 - 194
5.88. Zusammenfassung	Seite 195 - 196
5.89. Zusammenfassung	Seite 197 - 198
5.90. Zusammenfassung	Seite 199 - 200
5.91. Zusammenfassung	Seite 201 - 202
5.92. Zusammenfassung	Seite 203 - 204
5.93. Zusammenfassung	Seite 205 - 206
5.94. Zusammenfassung	Seite 207 - 208
5.95. Zusammenfassung	Seite 209 - 210
5.96. Zusammenfassung	Seite 211 - 212
5.97. Zusammenfassung	Seite 213 - 214
5.98. Zusammenfassung	Seite 215 - 216
5.99. Zusammenfassung	Seite 217 - 218
5.100. Zusammenfassung	Seite 219 - 220

Inhaltsverzeichnis

0. Abkürzungen	Seite	V
1. Einleitung	Seite	1 - 6
2. Substanzen		
2.1 Benz(a)pyren	Seite	7 - 11
2.2 Arochlor	Seite	12 - 15
2.3 Methylcholanthren	Seite	16 - 17
3. Methoden		
3.0 Substanzen	Seite	18
3.1 Rezeptur der Lösungen	Seite	19 - 20
3.2 Versuchstiere und ihre Haltung	Seite	29
4. Ergebnisse		
4.0 Erläuterungen	Seite	30
4.1 Benz(a)pyren	Seite	31 - 44
4.2 Arochlor 1254	Seite	45 - 57
4.3 Methylcholanthren	Seite	58 - 61
5. Diskussion		
5.1 Die "alkalische Elution"	Seite	62 - 63
5.2 Die Aktivität der mischfunktionellen Oxygenasen	Seite	64
5.3 Benz(a)pyren	Seite	65 - 66
5.4 Arochlor 1254	Seite	67 - 68
5.5 Methylcholanthren	Seite	69
5.6 Allgemeines	Seite	70
6. Zusammenfassung	Seite	71
7. Literatur	Seite	72 - 86
8. Lebenslauf	Seite	87 - 88
9. Danksagung	Seite	89

0. A b k ü r z u n g e n

AHH	- Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase
Ah-Rezeptor	- Aromatic hydrocarbon-Rezeptor
BaP	- Benzo(a)Pyren
DNA	- Desoxyribonucleinsäure
EDTA	- Ethylen-Dinitrilo-Tetraacetat
MAK	- Maximale Arbeitsplatz Konzentration
MFO	- Mischfunktionelle Oxygenasen
mRNA	- messenger Ribonucleinsäure
NADPH	- Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
PCB	- Polychlorierte Biphenyle
Tab.	- Tabelle
UV	- ultra-violett
z.B.	- zum Beispiel



1. E i n l e i t u n g

In den letzten Jahrzehnten hat die Suche nach den Ursachen der Tumorentstehung zunehmend an Bedeutung gewonnen. Neoplasmen bedingen circa 22 % aller vorzeitigen Todesfälle. Doll und Peto publizierten 1981 eine Statistik (Tab. 1) über die Faktoren, die für die Tumorentstehung von Bedeutung sind.

Tabelle 1:

Todeshäufigkeit nach Krebserkrankungen bezogen auf verschiedene Faktoren (nach Doll und Peto, 1981)	
<u>Faktor</u>	<u>Prozent aller erfassten</u> <u>Krebstoten</u>
Tabak	30
Alkohol	3
Ernährung	35
Lebensmittelzusätze	< 1
Sexualverhalten	7
Berufsbedingt	4
Umweltverschmutzung	2
Industrieprodukte	< 1
medizinische Behandlungen	1
geophysikalische Faktoren	3
Infektionen	? 10
Unbekannt	?

Bereits 1976 veröffentlichten Doll und Peto eine Studie, in der der Zusammenhang zwischen dem Rauchen und der Tumorentstehung deutlich wurde:

34440 britische Ärzte wurden über einen Zeitraum von 20 Jahren beobachtet. Während dieser Zeit starben 10072 von ihnen, davon 441 Raucher an Lungenkrebs und 1318 Raucher an anderen Tumorarten. Nur 10 Nichtraucher erkrankten an Lungenkrebs, 195 Nichtraucher starben an anderen Tumorarten.

Diese Statistiken sind sehr beeindruckend, jedoch erfordert ihre Erstellung lange Beobachtungszeiträume.

Eine schnellere Möglichkeit zum Aufzeigen eines Zusammenhangs zwischen Tumorentstehung und Rauchen ist der Nachweis auf molekularer Ebene, wie z.B. von Einzelstrangbrüchen an der DNA.

Nach Untersuchungen von Zahn (1983) haben Raucher mit zunehmendem Alter in der DNA nicht-mitotischer Gewebe mehr Einzelstrangbrüche als Nichtraucher.

Im Ansatz mit 10^5 Zellen erzeugt das Kondensat von einer Zigarette 10^4 Einzelstrangbrüche pro Zelle. Dabei wurde das Kondensat nur zum geringen Teil wirksam (Nakayama, T. et al. ; 1985).

10^{19} Einzelstrangbrüche entsprechen statistisch einem Lungentumortoten. (Zahn, 1985)

Es ist weitgehend anerkannt, daß DNA - Einzelstrangschäden mit der Tumorentstehung in Zusammenhang stehen:

Einen Hinweis auf diesen Zusammenhang ergibt sich z. B. aus dem gehäuften Vorkommen von Tumoren bei bestimmten genetischen Erkrankungen. (Spranger, 1985)

So ist beim Down-Syndrom das Risiko an einer Leukämieform zu erkranken erhöht.

Noch deutlicher wird dieser Zusammenhang bei der Erkrankung Xeroderma pigmentosum:

Auf Grund eines genetisch bedingten Mangels an einer DNA - Endonuclease können UV - Licht induzierte DNA - Schäden nicht oder nur schlecht repariert werden.

Es kommt frühzeitig zur Entwicklung von Hautkarzinomen und Basaliomen. (Happle, 1985)

Für alle daraufhin untersuchten Tumorpromotoren wurde gezeigt, daß sie DNA - Einzelstrangbrüche erzeugen. (Birnboim, 1983)

Bei 16 Hydazinderivaten konnte eine statistische Korrelation zwischen DNA - Einzelstrangbrüchen und der karzinogenen Potenz gezeigt werden. (Parodi et al., 1981)

In einer weiteren Untersuchung von Parodi et al. (1982) wurde für 21 andere Stoffe, 6 methylierende Agentien, 3 ethylierende Agentien, 5 aromatische Amine, 2 polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und 5 weitere Stoffe, darunter Aflatoxin B₁ und N⁻- Methyl - N'- nitro - N - nitrosoguanidin (MNNG) ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,738$ zwischen onkogener Potenz und der Zahl der Einzelstrangbrüche bestimmt.

Nach einer Arbeit von Sinex (1977) wird jeder Millionste Einzelstrangschaden nicht erkannt oder falsch repariert und führt zur Mutation.

Somit konnten dann auch alle oben genannten Substanzen im Ames - Test als mutagen identifiziert werden. (McCann et al., 1975)

Ames zählt Revertanten, um die Mutagenität eines Stoffes zu zeigen:

Dazu nimmt er Bakterien der Spezies *Salmonella typhimurium* und zwar die Stämme TA 1535, 1538, 98 und 100, für die die Aminosäure Histidin durch Mutation essentiell geworden ist. Durch Zugabe von mutagenen Substanzen entstehen unter anderen auch Rückmutanten, die Histidin wieder selbst produzieren können. Durch Bebrütung in Histidin-freien Nährmedien kann man diese nachweisen.

Ihre Zahl steht in Relation zur Zahl der entstandenen

Mutationen. (Ames et al., 1973, 1979)

Doch viele Substanzen, zum Beispiel auch Benz(a)pyren, werden in diesem Test erst als mutagen identifiziert, wenn man das System durch Lebermikrosomen von Wirbeltieren aktiviert, die zuvor mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen behandelt wurden.

Der dafür verantwortliche Bestandteil der Lebermikrosomen sind die mischfunktionellen Oxigenasen, ein Enzymsystem, das unter anderem polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oxidativ verändert. Dieser Enzymkomplex, kurz MFO genannt, läßt sich z. B. mit der Methode nach Nebert und Gelboin (1968a,b) relativ einfach in seiner Aktivität nachweisen.

MFO-Aktivitäten findet sich in zahlreichen Wirbeltiergeweben. Bei Ratten, Mäusen, Hamstern und Affen konnten Nebert und Gelboin diese bei 90 % aller untersuchten Gewebe feststellen. (1969)

Auch in menschlichen Geweben kann man MFO-Aktivität nachweisen, so zum Beispiel in Leber (Pelkonen et al., 1977), Lunge (Grover et al., 1973), Plazenta (Jacobsen et al., 1974), Lymphozyten (Kellerman et al., 1973), Monozyten (Bast et al., 1974) und in Alveolarmakrophagen (Cantrell et al., 1973)

Auch bei verschiedenen Fischarten findet sich das Enzymsystem (z.B. Kezic et al., 1983).

Induzieren lassen sich die MFO durch Xenobiotika, wie z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Gerhart und Carlson, 1978), polychlorierten Biphenylen (Addison et al., 1982) und polybromierte Biphenyle (Franklin et al., 1982).

Man kann also die MFO - Aktivität z.B. als Indikator für den Verschmutzungsgrad von Gewässern, insbesondere der Verschmutzung mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen bezeichnen.

Auf Grund der beschriebenen Eigenschaft wird der Nachweis der MFO - Aktivität oder des Enzymsystems weltweit als Untersuchungsmethode in Umweltstudien benutzt:

Eine Korrelation zwischen dem Verschmutzungsgrad von Wasser

und der MFO - Induktion konnte unter anderem Kezic et al. (1983) am Beispiel der jugoslawischen Flüsse Sava, Krka und Kupa feststellen.

Weitere Studien gab es in den USA im Michigan-See (Binder und Lech, 1984), in Neufundland im Baie Verte (Payne et al., 1984) in Jugoslawien in der Adria (Kurelec et al., 1977) und in der Nordsee (Davies et al., 1984)

Es gibt aber auch einen Zusammenhang zwischen der MFO-Aktivität und Karzinogenese:

Dies zeigen in beeindruckender Weise die Arbeiten der Gruppe Kellerman:

Sie fanden bei peripheren menschlichen Lymphozyten zwei bestimmende Allele, A und B, die in folgenden Kombinationen und mit folgender prozentualer Verteilung in der amerikanischen Bevölkerung gefunden wurden:

AA 45,0 %

AB 46,0 %

BB 9,4 %

Für die Gruppe mit AA fand sich eine geringe, mit AB eine mittlere und mit BB eine starke Induzierbarkeit der mischfunktionellen Oxigenasen.

Bei einer Studie mit 50 Rauchern, die an Bronchialkarzinomen erkrankt waren, gehörten

4 % der Gruppe mit AA

66 % der Gruppe mit AB und

30 % der Gruppe mit BB an.

Aus diesen Angaben ergibt sich, daß mit erhöhter Induzierbarkeit der mischfunktionellen Oxigenasen das Risiko an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, steigt.

Dies zeigt sich auch in einer Arbeit von Trell et al. (1984), die beschreibt, daß Menschen mit einer hohen Induzierbarkeit der MFO ein höheres Risiko haben, an durch Rauchen ausgelösten Tumoren zu erkranken.

Da Rauchen auch Einzelstrangbrüche auslöst, diese wiederum mit der Tumorentstehung in engen Zusammenhang gebracht werden können, scheint es eine Verbindung zwischen der Zahl der Einzelstrangbrüchen und der Aktivität der MFO zu geben.

Eine solche zeigt sich auch in einer Arbeit von Stüber und Zahn (1985):

Bei Regenbogenforellen, die infolge eines Unglücksfalles Flugzeug-Kerosin ausgesetzt waren, konnte man 3 Monate später zeigen, daß bei erhöhter DNA-Strangbruchzahl das Verhältnis von DNA-Schädigung zu MFO-Aktivität bei exponierten und nicht exponierten Fischen konstant war.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es, MFO-Aktivität und DNA-Einzelstrangbrüche auf mögliche Zusammenhänge zu untersuchen.

2. S u b s t a n z e n

2.1 Benz(a)pyren

Benz(a)pyren ist ein polyzyklischer, aromatischer Kohlenwasserstoff und Gegenstand zahlreicher Untersuchungen:

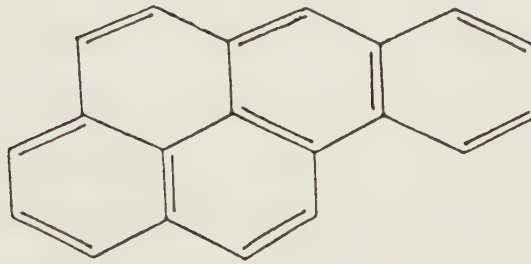


Fig.1: Benz(a)pyren

Seine karzinogene Potenz ist bekannt:

Das Auftragen von 0,4 μmol BaP auf die Haut von Mäusen alle zwei Wochen bewirkte innerhalb von 55 Wochen eine Tumorzinzidenz von 100 %. Die ersten Tumoren wurden nach 35 Wochen beobachtet (Levin et al.,1978).

BaP ist ein lipophiler, ubiquitär vorkommender Stoff, der bei fast allen Verbrennungsprozessen entsteht:

Tabelle 2: Bilanz der Benzo(a)pyren-Emission in der USA und Beträge einzelner Emittentengruppen (Der Bundesminister des Innern, 1979)

Emittentengruppe	BaP-Emission t/Jahr (USA)	Anteil an der jährl. BaP - Emission in %
Kraftfahrzeugverkehr:	22	1,7
Benzin: PKW	10	
LKW	12	
Diesel: LKW + Bus	0,4	
Heizungen:	475	38
Kohle: Haushaltsöfen	420	
große Heizungsanlagen	10	
Kohlekraftwerke	1	
Öl	2	
Gas	2	
Holz	40	
Abfallverbrennung:	563	45
Müllverbrennung	33	
offene Feuer:		
Wald- und Landwirtschaft	140	
Autobeseitigung	50	
Kohleabfall	340	
Industrieanlagen:	200	16
Crackanlagen	6	
Asphaltblasen	<1	
Koksherstellung (1,8 g/t)	192	

Über die Emission gelangt BaP in die Luft, und bei Kenntnis der Entstehung ist es einleuchtend, daß die BaP-Konzentrationen in Ballungsgebieten höher sind als auf dem Land.

Brockhaus und Mitarbeiter (1975) bestimmten das Mittel der Benz(a)pyren-Konzentration in verschiedenen Regionen Deutschlands in der Zeit von 1970 - 1973:

Gelsenkirchen	91,4 ng/m ³ Luft
Mannheim	10,5 ng/m ³ Luft
Schauinsland (Schwarzwald)	0,4 ng/m ³ Luft

Björseth und Mitarbeiter (1979) zeigten auch die jahreszeitabhängigen Schwankungen der BaP - Pegel. So ist im Winter die BaP - Konzentration der Luft wesentlich höher als im Sommer. Dieses ist auf die jahreszeitlich bedingte Zunahme der Haushaltsfeuerungen zurückzuführen .

Die Bedeutung der BaP - Konzentration in der Luft zeigt eine Arbeit von Pott (1985):

Das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, beträgt in der Allgemeinbevölkerung 0,05 ‰ pro ng BaP/m³ Luft nach 50 Expositionsjahren. Bei Kokereiarbeitern zeigte sich ein relatives Risiko von 1 % je µg BaP/m³ am Arbeitsplatz nach 25 jähriger Beschäftigungsdauer.

Pott zeigt in dieser Arbeit, daß die Beziehung der inhalierten BaP-Menge (in mg) zum Lungenkrebsrisiko durch Kokereigas linear ist. Ebenso verhält es sich mit dem Lungenkrebsrisiko durch das Rauchen.

Doch bei gleicher BaP-Menge ist die Inhalation von Zigarettenrauch 30 - 40 mal wirksamer als von Kokereigas, was auf weitere Karzinogene hindeutet.

BaP befindet sich jedoch auch in Nahrungsmitteln:

Getreide enthält 0,25 - 0,84 µg/kg Trockengewicht, Salat 2,8 - 5,3, Spinat 7,4, Tomaten 0,22, gekochtes Fleisch oder Fisch 0,2 - 11,2, gebratenes oder gegrilltes Fleisch oder Fisch 0,2 - 107 µg BaP/Kg, Kaffee 0,1 - 4, Tee 3,9 - 21,3 µg/kg Trockengewicht (Baum,1978).

Eine epidemiologische Studie von Scheller zeigt eine Senkung der im Blut vorkommenden Immunfaktoren durch PAH. Die Verschlechterung der allgemeinen, konstitutionellen Immunität erhöht das Anfälligkeitsrisiko zur Krebserkrankung. Dies ist ein Erklärungsansatz der Karzinogenese.

Für Benz(a)pyren ist der Weg der Krebsentstehung biochemisch bereits relativ gut erklärt:

Abb.: 1

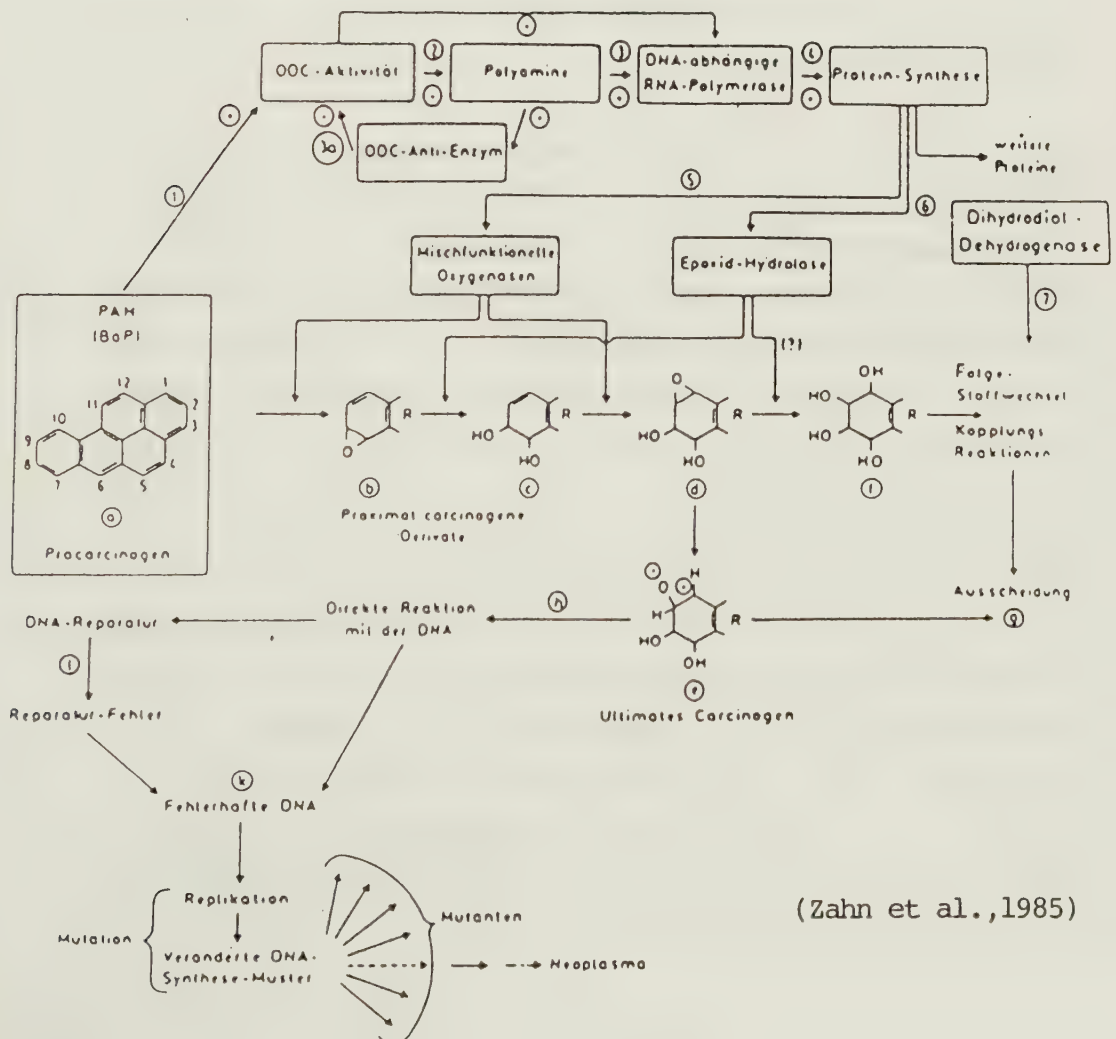
Die gezeigte Ereigniskette wird in diesem Beispiel eingeleitet durch Erstkontakt eines bis dahin unerfahrenen Wirbeltieres mit Benzo(a)pyren (BaP). Dabei ist nur eine Teilauswahl der tatsächlich abgelaufenen Reaktionen wiedergegeben. (1) Das Präkarzinogen ruft eine Steigerung der Ornithindecarboxylase - Aktivität (ODC) hervor (Byus et al., 1976), die zu (2) einer erhöhten Polyamin-Synthese führt (Russell, 1973) und eine (3) vermehrte RNA-Synthese nach sich zieht (Russell, 1971; Jacob und Rose, 1976). Dieser letztere Effekt wird noch verstärkt durch (2a) eine direkte Einwirkung der ODC (DePierre und Ernster, 1978). Sobald hohe Spiegel an Polyaminen auftreten, wird ODC-Antizenzym induziert (Heller et al., 1976).

Unter vielen vorkommenden PAH ist BaP nur einer; BaP gehört aber zu einer besonderen Gruppe, die besondere Reaktionswege auszeichnet. Von den vielen, möglichen Reaktionswegen des BaP ist wiederum nur einer, zu einem "ultimaten Carcinogen" führende, aufgezeigt. Diese elektrophilen Moleküle können mit vielen anderen Molekülen, darunter bemerkenswerterweise auch DNA, direkt koppeln. So wird das Präkarzinogen (a) BaP durch MFO unter Verwendung von Sauerstoff u.a. zu dem 7,8-Epoxid (b) und durch Einwirkung von Epoxid-Hydrolase in ein 7,8-trans-Diol (c) umgewandelt, das neuerlich durch MFO umgesetzt wird und damit zwei Diesteromere von 7,8-Diol-9,10-Epoxid (d) liefert. Beide proximatene Carcinogene gehen in "ultimate Carcinogene" über, die wahrscheinlich (e) als Carbenium-Ionen direkt mit vielen

Nucleophilen (h) (Yang et al., 1977) in sehr spezifischer Weise reagieren (Meehan und Straub, 1979; Deutsch et al., 1978). Viele der Produkte aus den Reaktionen mit MFO, Epoxidhydrolasen, Glutathion-S-Transferase, UDP-Glucuron-säure -Transferase und Sulfattransferase können umgewandelt und/oder gekoppelt und dadurch (f) entgiftet und (g) ausscheidbar werden (Yang et al., 1978; Oesch, 1982).

Die Wechselwirkung der DNA mit ultimatem Carcinogen (Miller und Miller, 1981) hat Strangbrüche im Gefolge (Ganper et al., 1977).

Die Veränderungen der DNA verursachen das Einsetzen von Reparaturvorgängen (i), die bis zu einem gewissen Grade die Fixierung einiger Fehler verursachen (l) (Hanawalt und Friedberg, 1978). Letzten Endes führt dies alles dazu, daß DNA-Veränderungen (k) zu Mutagenese und/oder Carcinogenese führen (Ames et al., 1975; Huberman und Sachs, 1974, 1977). Dies schließt nicht aus, daß sich noch weitere und andere Konsequenzen von DNA-Veränderungen ergeben können.



2.2 Arochlor

Arochlor ist der Handelsname in der USA für ein Gemisch, das polychlorierte Biphenyle enthält. Der in der Bundesrepublik übliche Handelsname ist "Clophen" (Bayer Leverkusen). Die gesamte Familie der polychlorierten Biphenyle, kurz PCB, hat 209 Mitglieder, die sich durch ihren Chloranteil und die Isomerenzusammensetzung von einander unterscheiden (Mullin M.D. et al., 1984).

Das von mir benutzte Arochlor 1254 ($C_{12}H_5Cl_5$) hat einen Chloranteil von 54 % und folgende prozentuale Isomerenzusammensetzung:

16 % mit 4 Cl-Atomen pro Molekül

60 % mit 5 Cl-Atomen pro Molekül

23 % mit 6 Cl-Atomen pro Molekül

1 % mit 7 Cl-Atomen pro Molekül

(Heit, M. et al., 1984)

Polychlorierte Biphenyle sind fettlösliche Substanzen, deren Viskosität und Stabilität mit steigendem Chloranteil zunimmt. Isomere mit mehr als vier Chloratomen sind theoretisch nicht mehr brennbar und nicht mehr oxidierbar und zählen somit zu den stabilsten organischen Verbindungen. Diese Eigenschaften sind Grundlage der industriellen Nutzung von PCB, in der Elektroindustrie auf Grund der guten Isoliereigenschaften in Kondensatoren und Hochspannungstransformatoren, in der Chemischen Industrie zur Herstellung feuersicherer Farben und Lacke und als Weichmacher für Kunststoffe (Borneff, 1982).

PCB hat einen sehr niedrigen Dampfdruck und verflüchtigt sich zusammen mit Wasserdampf. Diese physikalischen Eigenschaften haben großen Anteil an der ubiquitären Verteilung der Substanzgruppe (Moll, 1988).

Bedeutende Mengen an PCB gelangen durch Verbrennungsanlagen in die Umwelt, die, auf Grund der Stabilität der PCB, diese

unverändert in die Atmosphäre abgeben (Borneff, 1982).

Erst bei Temperaturen über 1200°C zersetzt sich PCB. Doch schon bei Erhitzung auf mehrere hundert Grad Celsius entstehen so hoch toxische Substanzen wie Dioxine und Furane in nicht unerheblicher Menge.

Schon in den handelsüblichen PCB - Sorten finden sich Polychlordibenzodioxine und - furane als Verunreinigungen und haben ihren Anteil an den toxischen Wirkungen der polychlorierten Biphenyle (Moll, 1988).

Todesfälle durch PCB zeigten sich bereits wenige Jahre nach Beginn der industriellen Nutzung, auf Grund schwerer Schäden von Leber, Milz, Pankreas, Nieren und Nebennieren (Greenberg et al., 1939).

Zu Massenvergiftungen mit PCB kam es 1968 in Japan. Im ersten Jahr danach wurde eine Verminderung des Wachstums von Schulkindern festgestellt. Die Wachstumsgeschwindigkeit dieser Kinder normalisierte sich aber später wieder (Yoshimuro et al., 1978). Der Begriff der Yusho - Krankheit wurde geprägt: Je nach Schwere äußert sich die Erkrankung durch Hautveränderungen, Ausschläge, Dunkelfärbung der Haut, Leber -, Milz - und Nierenschäden oder Ausbildung maligner Tumoren. 90 % der Kinder von vergifteten Schwangeren kamen mit starken Hautveränderungen als sogenannte "schwarze Babys" zur Welt (Pschyrembel, 1988).

Eine weitere Massenvergiftung mit PCB ereignete sich 1979 in Taiwan (Kashimoto T. et al., 1981), wo PCB - Öl in Reisöl gelangte, das zu Speisezwecken verwandt wurde.

Daß PCB für uns Menschen keine unerhebliche Rolle spielt, sieht man auch bei der Betrachtung folgender Fakten:

Am Hygiene - Institut der Universität Mainz wurden 1980 in einer Serie von Trinkwässern verschiedene PCB-Vertreter bestimmt:

Tabelle 3:

PCB in Trinkwässern (aus 23 Grundwasserwerken) in ng/l

Substanz	Mittelwert	Standardabweichung
2,4,4'-Trichlorbiphenyl	0,32	0,10
2,5,2',5'-Tetrachlorbiphenyl	0,51	0,17
2,4,5,2',5'-Pentachlorbiphenyl	0,48	0,17
2,4,5,2',3'-Pentachlorbiphenyl	0,04	0,01
2,3,6,2',5'-Pentachlorbiphenyl	0,99	0,36
2,4,5,2',4',5'-Hexachlorbiphenyl	0,53	0,20
2,3,4,5,2',5'-Hexachlorbiphenyl	0,17	0,08
2,4,6,2',4',6'-Hexachlorbiphenyl	0,36	0,13
Summe	3,34	1,18

(Die Summenbestimmung von PCB auf einer gepackten Säule als Clophen A 60 ergab im Mittel einen 2,8fach höheren Wert.)

(Borneff, 1982)

Polychlorierte Biphenyle werden in menschlichen Fettgeweben gespeichert (Acker und Schulte, 1970). Bei Hungerzuständen und Unterkühlung wird Fettgewebe kurzfristig mobilisiert, was zu erheblichen Erhöhungen der PCB - Konzentration im Blut führt.

Über eine Anreicherung im Verlauf der Nahrungskette kommt es zu hohen Arochlor-Konzentrationen z. B. in Fischen, wie es von verschiedenen Autoren beschrieben wird (z.B. Mowrer et al., 1982)

Ein zusammenfassenden Bericht über PCB in der menschlichen Umwelt und im Menschen gab B. G. Bennett (1983). Die Aufnahme erfolgt über die Atemwege, die Haut und vor allem die Nahrung. Leber und Fettgewebe speichern PCB. Unspezifische Anzeichen von Intoxikationen sind:

Hautpigmentation, Übersekretion der Augen, Atemstörungen, Müdigkeit, Leibweh, Empfindungslosigkeit der Glieder, Schwellung der Gelenke (z. B. Finger), Kopfschmerzen, Abnormalitäten des Blutfettes, dermatologische Schäden, bei Kindern: Verlust der immunologischen Abwehrkräfte, Lern- und

Verhaltensschwächen (Moll, 1988).

Die Höhe der Triglyceride im menschlichen Blut korreliert mit dem PCB - Gehalt (A. D. Stark et al., 1986)

PCB geht in die Muttermilch über und stellt somit eine Gefährdung Neugeborener dar (Yakushiji et al. 1984)

Frühgeburten und Aborte scheinen bei Frauen mit hoher PCB - Belastung häufiger vorzukommen als bei Unbelasteten. (Wassermann M. et al., 1982; Bercovici B. et al., 1983).

Der karzinogene Effekt von PCB ist umstritten. Die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) hat PCB in die Liste der Stoffe mit begründeten Verdacht auf krebserzeugendes Potential eingeordnet.

Über eine Hepatomentwicklung bei gemeinsamer Verfütterung von HCH und PCB berichten Kimbrough und Mitarbeiter (1974). Dieser Effekt bleibt bei einzelner Gabe der Stoffe aus.

1975 finden diese Autoren bei ihren Karzinomexperimenten mit Arochlor 1254 und Arochlor 1260 keine eindeutigen Ergebnisse, doch müssen verschiedene PCB-Arten als Karzinogene verdächtigt werden.

Einen wichtigen Hinweis dafür geben auch die Arbeiten von Unger et al. (1980).

Es fand sich eine signifikante Beziehung vom Gehalt an PCB und DDE im Fett von Personen, die mit oder ohne Krebs gestorben waren.

Da PCB als potente Induktoren für mischfunktionelle Oxigenasen bekannt sind, habe ich als eine Untersuchungssubstanz meiner Arbeit Arochlor 1254 ausgewählt.

2.3 Methylcholanthren

3-Methylcholanthren ist eine in der biochemischen Forschung oft verwendete Substanz, die zur Gruppe der polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffe gehört:

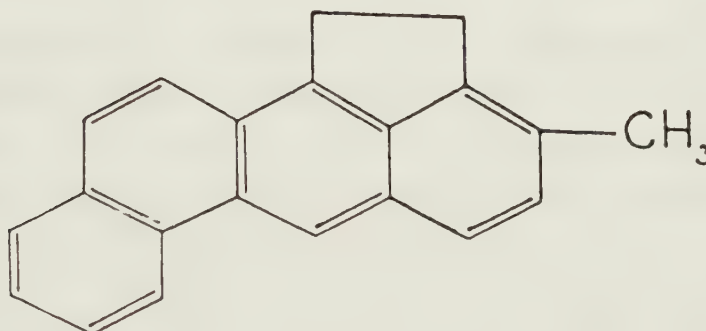


Fig.2: 3-Methylcholanthren

So spielt 3-Methylcholanthren bei Untersuchungen der Enzyminduktionsvorgänge eine wichtige Rolle.

Enzyminduktion ist ein wesentlicher biochemischer Vorgang, einerseits weil sie wichtig ist, um eine schnelle Entgiftung des Körpers bei Überlastung mit einer bestimmten Noxe zu gewährleisten, andererseits weil durch die von ihr bedingte Änderung der Leberfunktion lebenswichtige Stoffe wie Sexualhormone, Corticosteroide und Vitamin D nicht mehr ausreichend produziert werden.

Man kennt verschiedene Induktionstypen, so den Phenobarbital-Typ und den Methylcholanthren-Typ. Es werden jeweils mischfunktionelle Oxigenasen induziert (Kuschinsky, G., Lüllmann, H., 1984).

Beim Phenobarbital-Typ ist die terminale Oxidase des Systems das Cytochrom P-450, beim Methylcholanthren-Typ das Cytochrom P-448.

Das Enzymsystem vom Methylcholanthren-Typ läßt sich auch durch Benz(a)pyren und Arochlor 1254 induzieren.

Die Induktion dieses Enzymsystems erfolgt über den sogenannten Ah-Rezeptor, Ah für "aromatic hydrocarbon". Der Ah-Rezeptor ist ein lösliches intrazelluläres Protein, das unter andern in Ratten- und Mäuselebern und menschlichem Plazentagewebe nachgewiesen werden konnte. Es reguliert die Transkription der AHH - mRNA. Dieser Rezeptor geht Verbindungen mit Methylcholanthren, Benz(a)pyren und ähnlichen Substanzen ein und bindet sich dann an spezifische Genregionen (Manchester D.K. et al., 1987)

Desweiteren ist Methylcholanthren durch den Ames-Test als mutagen und karzinogen identifiziert worden (Ames, 1975/12). Über die erste sichere In-Vitro-Demonstration einer karzinogen-induzierten, neoplastischen Transformation von Zellen berichteten Berwald und Sachs:

Zweitkulturzellen von syrischen Hamsterembryozellen wurden mit 3-Methylcholanthren behandelt. Nach der Behandlung fanden sich in der Kultur Zellen, die, im Gegensatz zu nicht behandelten Zellen, bei Injektion in Hamster in der Lage sind, primäre Fibrosarkome zu erzeugen.

Es wurde gezeigt, daß die Transformation der C3H/10T1/2-Mäuse-Embryo-Zellen in Kultur durch Methylcholanthren über die Aktivierung des k-ras-Onkogens erfolgen kann. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, daß diese Aktivierung von der Höhe des Schilddrüsenhormonspiegels abhängig ist (Guernsey, L.D., Leuthauser, S.W.C., 1987)

3-Methylcholanthren ist also eine potente karzinogene Substanz. Als typischer Induktor der mischfunktionellen Oxigenasen habe ich auch diese Substanz in meine Arbeit aufgenommen.

3. Methoden

3.0. Substanzen

Rinderserum-Albumin wurde von Boehringer Mannheim bezogen, Arochlor 1254 von Analabs (Antechnica), Karlsruhe, Benz(a)pyren von Sigma-Chemie, München, Bisbenzimid von Hoechst AG, Frankfurt a.M., Methylcholanthren von Sigma-Chemie, München, NADPH₂ von Boehringer Mannheim und alle weiteren Chemikalien von E. Merck, Darmstadt oder Sigma-Chemie, München.

Alle Substanzen waren vom Reinheitsgrad "pro Analysis", "für die Fluoreszenzspektroskopie" oder "für biochemische Zwecke".

3.1. Rezeptur der Lösungen

Folgende Lösungen wurden bis auf die erwähnten Ausnahmen alle 4 Wochen frisch hergestellt und bei Zimmertemperatur (circa 20°) bereitgehalten:

<u>Nr.</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
I.	EDTA-Puffer	10 mM Ethylen - Dinitrilo - Tetraacetat (Natriumsalz) 5 mM Natriumbisulfid NaHSO_3 150 mM KCl ph 0 7,4 NaOH eingestellt
II.	Merchants`s Solution	140 mM NaCl 1,47 mM Kaliumdihydrogen- phosphat KH_2PO_4 2,7 mM KCl 8,1 mM Natriumbiphosphat Na_2HPO_4 0,53 mM Ethlen - Dinitrilo - Tetraacetat (Natriumsalz) ph 7,4 mit NaOH eingestellt
III.	Lyse-Puffer	0,2 % Natrium - Lauryl - Sarcosinat (Na-Salz) 2 M NaCl 20 mM Ethlen - Dinitrilo - Tetraacetat (Natriumsalz) ph 10 mit HCl eingestellt

IV.	Waschpuffer	20 mM Ethlen - Dinitrilo - Tetraacetat (Natriumsalz) ph 10 mit NaOH eingestellt
V.	Elutionspuffer	20 mM Ethlen - Dinitrilo - Tetraacetat (Natriumsalz) ph 12,5 mit Tetra- äthylammoniumhydroxid Da die Lösung instabil ist, muß sie unmittelbar vor Gebrauch angesetzt werden.
VI.		150 mM NaCl 15 mM tri - Natriumcitrat $C_6H_5Na_3O_7$ ph 7,0 mit HCl eingestellt
VII.		1,3 M Kaliumdihydrogen - phosphat KH_2PO_4
VIII.	AHH - Puffer	0,05 M Tris - HCl 0,25 M Saccharose
IX.	Benz(a)pyren-Lösung	0,5 mg Benz(a)pyren pro ml Methanol Die Lösung muß lichtgeschützt und kühl (4° C) aufbewahrt werden.
X.	NADPH ₂ - Lösung	1,25 mg NADPH ₂ pro ml AHH - Puffer
XI.	Lowry - Puffer	2 % Na ₂ CO ₃ in 0,1 N NaOH
XII.	Seignettesalz-Lösung	1 % K-Na-Tartrat in H ₂ O

XIII.

5 mg CuSO_4
+ 1 ml Lösung XII

Die Lösung muß unmittelbar vor Gebrauch angesetzt werden.

XIV.

50 ml Lösung XI
+ 1ml Lösung XIII

3.2 Versuchstiere und ihre Haltung

Als Versuchstiere verwendete ich einjährige Spiegelkarpfen aus der Fischzucht Orth in Harthausen (Pfalz), die in unserem Institut bei 13°C gehältert wurde. Das Gewicht der Fische lag zwischen 18 und 34 g.

Während des Versuchs befanden sich die Fische in Becken mit 8l Wasser bei einer Temperatur von 20°C. In jedem Becken befanden sich maximal 2 gleichartig behandelte Fische. Während des Versuchs wurden die Fische nicht gefüttert.

Als Untersuchungsmaterial diente die Leber, die unmittelbar nach dem Töten der Fische unter Schonung der Gallenblase herauspräpariert und auf mehrere Eppendorfhütchen mit jeweils 400 µl eisgekühltem EDTA-Puffer verteilt wurde.

Alle Proben, bis auf die für die Alkalische Elution, die unmittelbar weiter verarbeitet werden müssen, wurden nach der Gewichtsbestimmung sofort bei 18°C eingefroren.

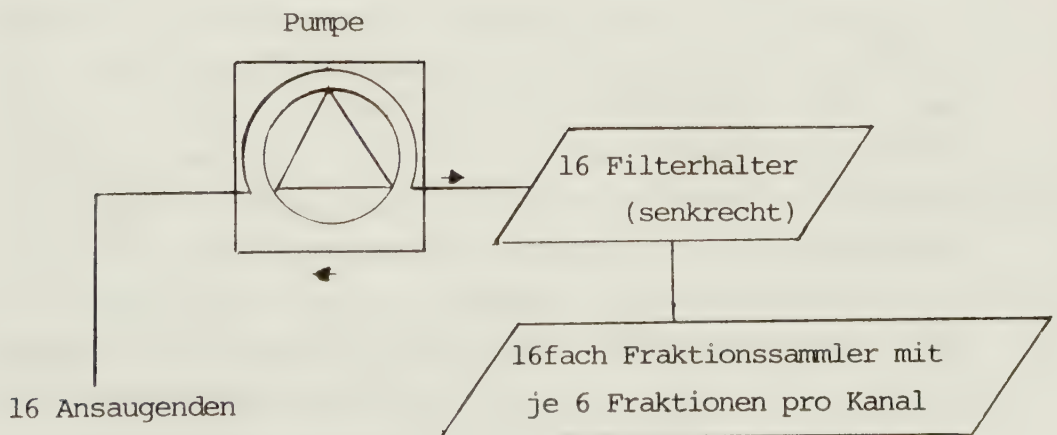
3.3 Alkalische Elution

Zur Bestimmung des Schädigungsgrades der DNA wurde die alkalische Elutionstechnik von Kohn et al. (1976) verwendet. Mit dieser Methode erhält man eine relative Maßzahl für die Anzahl von Einzel- und Doppelstrangbrüchen und alkalilabilen Stellen:

3.3.1 Apparatur

- 16fach Schlauchpumpe mit einstellbaren Geschwindigkeiten von 0,2 und 0,05 ml/min/Kanal
- 16fach Filterhalter für Filter mit 25mm Durchmesser. (Millipore)
- 16fach Fraktionssammler mit jeweils 6 Fraktionen pro Kanal
- Filtermembranen: Millipore Corp., GWP 025 00
- 16fach Schüttelmaschine für 20 ml Weithals-Flaschen

Abb.2: Schema des Aufbaus der Apparatur



3.3.2 Präparation

Die Filterhalter werden jeweils mit einem Filter bestückt. Dies geschieht in Aqua destillata, damit die Filtermembranen nicht mit Luftblasen verlegt werden, und mit Handschuhen, zum Schutz gegen Verunreinigungen.

Nach dem Zusammenbau werden die Filtergehäuse lichtundurchlässig eingepackt, da Licht die DNA besonders bei alkalischem pH in den Filterhaltern unkontrolliert weiterschädigen würde.

Die Filterhalter und Schlauchsysteme werden mit Merchant's Solution (II.) gefüllt.

Nun erfolgt die Präparation der Fischlebern (siehe 3.3.1). Von jedem Karpfen wird ein Eppendorfhütchen mit Leber für die "Alkalische Elution" weiterverarbeitet. Das Leberstückchen wird im Eppendorfhütchen homogenisiert. Pro Kanal trägt man 1 % der gesamten Leber eines Karpfens auf die Membran auf. Anschließend wäscht man die Leberzellen mit 5 ml Merchant's Solution (II.) pro Kanal bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,2 ml/min. Bei gleichbleibender Geschwindigkeit werden die Zellen mit je 4,5 ml Lyse-Puffer (III.) pro Kanal lysiert. Danach folgt wieder ein Waschschriff, jetzt mit 10 ml Waschpuffer (IV.) pro Kanal, wobei nun im wesentlichen nur noch die DNA auf den Filtern verbleibt.

Nun füllt man das System mit Elutionspuffer (V.) (25 Minuten lang bei 0,2 ml/min und 10 Minuten lang bei 0,05 ml/min). Das bisher angefallene Eluat wird verworfen. Es wird weitere 6 Stunden lang Elutionspuffer (V.) durchgepumpt, bei einer Geschwindigkeit von 0,05 ml/min. Das entstehende Eluat wird, stundenweise fraktioniert, in 6 Reagenzgläsern aufgenommen. Um auch die Menge der DNA zu erfassen, die im Schlauchsystem verblieben ist, wird es im Anschluß 5 Minuten bei 0,2 ml/min gespült und danach mit Druckluft ausgeblasen. Die dabei anfallende Flüssigkeit wird jeweils in einem 7. Reagenzglas als sogenanntes "Totvolumen" aufgefangen. Die auf den Filterblättchen zurückgebliebene DNA gelangt zur Messung,

indem man diese in 5 ml Elutionspuffer (V.) in 20 ml-Weithalsflaschen 2 Stunden lang ausschüttelt.

3.3.3 Fluorimetrische Messung der DNA

Als relative Maßzahl für den Grad der Schädigung die DNA dient bei dieser Methode die Elutionsgeschwindigkeit:

Je mehr die DNA geschädigt ist, um so schneller entwindet sie sich in alkalischem Milieu, desto schneller verlassen die DNA-Bruchstücke die Filtermembran.

So ist ein wesentlicher Punkt der "Alkalischen Elution" die Bestimmung des DNA-Gehalts jeder einzelnen Fraktion.

Die Messung wurde mit der von Stout und Becker (1982) entwickelten Methode in der Modifikation nach Stüber (1985) durchgeführt. Mit dieser Methode kann man die Menge an Einzelstrang-DNA bis zu einer unteren Grenze von 100 ng zuverlässig bestimmen.

Wichtigste Substanz ist das 1972 von Hilwig und Gropp eingeführte Flurochrom Bisbenzimid, das zunächst zur Chromosomenfärbung eingesetzt wurde (Hiwig und Gropp, 1973; Binder und Kim, 1975).

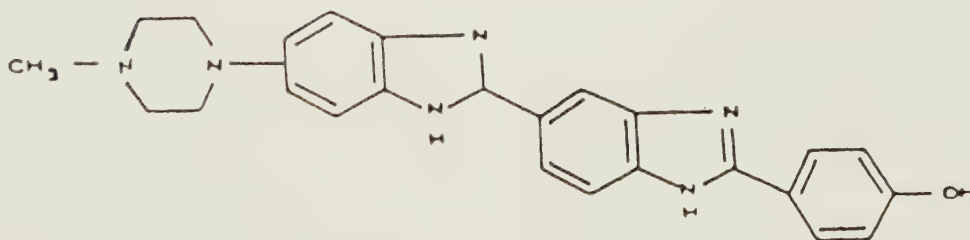


Fig.3: Bisbenzimid

((2-(2-(4-Hydroxyphenyl)-6-benzimidazolyl)
-6-(1-methyl-4-piperazyl)benzimidazol x 3 HCl))

Prinzip der Methode ist, daß Bisbenzimid in neutralem Milieu an Einzelstrang-DNA bindet und eine meßbare Fluoreszenz entwickelt. Hierzu geht man wie folgt vor:

Man setzt eine 7,5 μ molare Lösung von Bisbenzimid in Puffer VI. an, und zwar unmittelbar vor der Messung, da die Lösung instabil ist. Die Konzentration stellt man dabei durch Photometrie ein, wobei der Extinktionskoeffizient

$$410\,000\text{ cm}^2\text{ pro Mol bei }338\text{ nm}$$

beträgt. Diese Lösung verdünnt man im Verhältnis 5:1 mit 1,3 molarer KH_2PO_4 -Lösung, die zur Neutralisation des Eluats dient. Nun wird pro Kanal jeweils 1ml jeder Fraktion, der Totvolumens, der Filterschüttellösung und des Elutionspuffers mit je 0,3 ml dieser frischen Lösung versetzt, geschüttelt und zur Messung gebracht.

Gemessen wird die relative Fluoreszenz gegen einen Fluoreszenzstandard von 0,2 μg Chininsulfat pro ml 0,1 N H_2SO_4 bei 350 nm Immision und 450 nm Emission.

3.3.4 Auswertung

Zur Beurteilung des Ergebnisses vergleicht man den prozentualen Rückgang des DNA-Gehalts vom Filter, ausgehend von einem theoretischen Wert 100 %, mit den aufsummierten Elutionsvolumina, ausgehend von 0 ml.

Die Wertepaare bilden eine Elutionskurve, die man an folgende Funktionsgleichung anpassen kann:

$$y = ae^{-bx}$$

b ist hierbei die Steigung der Ausgleichsgerade und beschreibt somit den Schädigungsgrad der DNA gut.

b wird wie folgt errechnet:

$$b = \frac{\sum x_i \ln y_i - \ln y_0 \sum x_i}{\sum x_i^2}$$

x = Elutionsvolumen

y = prozentualer Anteil an der Gesamtfluoreszenz

i = 1,2,...6

y₀ = 100

(Hartung et al., 1982; Emmig, K., 1987)

Um die Versuche besser untereinander vergleichbar machen zu können, werden die b-Werte der Kontrollen eines Versuchs gemittelt ($\bar{b}$) und das Verhältnis der b-Werte der Versuchsergebnisse mit diesem Mittelwert gebildet (b/ $\bar{b}$).

3.4 MFO-Test

Nach der fluorimetrischen Methode von Nebert und Gelboin (1968a) bestimmt man die spezifische Benz(a)pyren-Monooxygenase-Aktivität als repräsentative Größe für die mischfunktionellen Oxigenasen.

Gemessen wurde an einem Zeiss Spektralfluorimeter PMQ3, der mit zwei Prismenmonochromatoren und einer Xenon-Hochdrucklampe ausgerüstet ist.

Die eingefrorenen Proben mit Leber in EDTA-Puffer (I) (siehe 3.2) werden aufgetaut, die Leberstückchen im Puffer homogenisiert und 7 Minuten lang in einer Eppendorftischzentrifuge zentrifugiert.

Vom Überstand entnimmt man die Menge, die etwa 4mg Leber enthält und füllt diese mit AHH-Puffer (VIII) auf 100 µl auf. Zu dieser Lösung gibt man jeweils eine frische Mischung von 400 µl AHH-Puffer (VIII) und 50 µl NADPH₂-Lösung (X). Von jeder Leberprobe macht man mehrere Versuchsansätze.

Zu jedem Versuchsansatz gibt man nun möglichst zügig 40 µl BaP-Lösung (IX) und inkubiert dieses dann 20 Minuten lang im Wasserbad mit 27°C in Dunkelheit.

Anschließend stoppt man die Reaktion durch Zugabe von jeweils 500 µl Aceton. Blindwerte erhält man, indem man das Aceton vor der BaP-Lösung zum Versuchsansatz gibt.

Nun pipettiert man zu jedem Versuchsansatz 3ml Hexan und schüttelt damit die entstandenen BaP-Derivate aus. Nach der Trennung der Phasen entnimmt man jeweils 2ml die Hexan-Phase, der oberen der beiden. Diese mischt man mit 4ml 1N NaOH-Lösung und schüttelt die BaP-Derivate in die NaOH-Lösung aus, Nach der Trennung der beiden Phasen verwirft man die obere, die Hexan-Phase, und mißt die Fluoreszenz der unteren, der NaOH-Phase.

Gemessen wird gegen eine 0,5 µg Chininsulfat/ml 0,1N H₂SO₄-Lösung als 100 %-Standard mit einer Immission von 360nm und einer Emission von 520nm.

Die spezifische Benz(a)pyren-Monooxygenase-Aktivität berechnet sich nach folgender Formel:

$$A = \frac{1,5 \times (F - F_0) \times V_1 \times K}{P \times t \times V_2}$$

A : spezifische Aktivität in pMol 3-OH-BaP-Äquivalenten pro
mg Protein x Minute

F : mittlere Probenfluoreszenz

F₀ : mittlere Blindwertfluoreszenz

K : Umrechnungskonstante vom Chininsulfatstandard in einen
entsprechenden 3-OH-Benz(a)pyren-standard: 970 pMol/min

V₁ : Gesamtreaktionsvolumen: 1000 µl

V₂ : Enzymlösungsvolumen: 100 µl

P : Proteinkonzentration der Enzymstammlösung (mg/ml)

t : Reaktionszeit in Minuten (20 min)

Der Umrechnungsfaktor der oben definierten Aktivitätseinheit in kat (3-OH-BaP-Äquivalente)/kg, die international übliche Aktivitätseinheit, beträgt 6×10^7 .

Ich bin jedoch bei obiger Einheit geblieben, da sie die gebräuchlichere in der Literatur über Mischfunktionelle Oxygenasen ist.

3.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Berechnung der Aktivität der mischfunktionellen Oxigenasen benötigt man den Wert der Proteinkonzentration der Enzymstammlösung.

Ich habe diese Konzentration mit der Methode nach Lowry (1951) bestimmt:

Man setzt dazu von jeder Probe eine Verdünnungsreihe an:

Von jedem Überstand pipettiert man jeweils 5 µl, 7,5 µl und 10 µl ab und füllt diese mit Lowry-Puffer (XI) auf 200 µl auf. Dazu gibt man 1 ml Lösung XIV.

Als Standard benutzt man Rinderserumalbumin in einer Konzentration von 0,25 mg/mlH₂O. Man setzt mehrere Standards an, indem man jeweils 200 µl Standardlösung mit 1 ml Lösung XIV mischt.

Als Nullwert für die Extinktionmessung nimmt man 200 µl Lowry-Puffer (XI) mit 1 ml Lösung (XIV).

Alle Ansätze mischt man gut durch und läßt sie 10 Minuten stehen.

Nun gibt man 0,1 ml Folin-Phenolreagenz zu allen Ansätzen, mischt diese wiederum gut durch und läßt alles nun 30 Minuten stehen.

Danach bestimmt man die Absorbtion bei einer Wellenlänge von 740 nm und kann dann die Proteinkonzentration der einzelnen Proben berechnen.

4. E r g e b n i s s e

4.0 Erläuterungen

Die als Kontrollen bezeichneten Fische wurden gemeinsam mit den Versuchstieren gehalten und, um die Beeinträchtigung des Versuchs durch die Injektion als solches auszuschließen, mit je 10 µl Sesamöl pro g Fisch behandelt.

Die angegebenen Konzentrationen der untersuchten Substanzen wurden jeweils pro g Fisch injiziert und in solcher Konzentration in Sesamöl gelöst, daß je 10 µl Sesamöl pro g Fisch als Lösungssubstanz benutzt wurden.

Der MFO-Wert wird in der vorliegenden Arbeit immer in der Einheit

pmol-OH-BaP-Äquivalente pro mg Protein x Minute

angegeben. Die nachfolgenden Werte werden zur Vereinfachung ohne Einheit dargestellt.

Mit der Inkubationszeit ist jeweils der Zeitraum zwischen der Injektion des Fisches mit der untersuchten Substanz und dem Tod des Fisches gemeint.

Auf die Berechnung von b und dem Wert b/b bin ich bereits im Kapitel 3.3.4 eingegangen.

Der Korrelationskoeffizient wurde nach Michaelis (1980) berechnet, die Zahl n gibt die bei der Berechnung berücksichtigte Anzahl der Fische an.

4.1. Benz(a)pyren

Tabelle 4: Kontrollen

<u>Art</u>	<u>$\bar{b}$</u>	<u>$b/\bar{b}$</u>	<u>MFO</u>
0	- 0,0565	1,150	0,047
		0,85	0
	- 0,0653	1	0,117
	- 0,056	1	0
		1	0,102
	- 0,083	1	0
	- 0,0625	0,896	0,06
		1,104	0,09
	- 0,059	1	0,35
	- 0,0458	0,989	0,122
		1,063	0
		0,950	0
	- 0,065	1,008	0,035
		0,992	0,008
	- 0,0598	1,033	0,032
		0,958	0,013
	- 0,0518	0,994	0
		1,004	0,005
	- 0,0555	0,973	0,008
		1,027	0,037
	- 0,0627	1	0,032
	- 0,078	1	0,42
	- 0,052	1	0
	- 0,070	1	0,02
	- 0,035	1	1,99

Der Mittelwert der b/b - Werte beträgt 1, die Standardabweichung 0,057. Der Mittelwert der MFO beträgt 0,140, die Standardabweichung 0,400.

Die individuellen Schwankungen zwischen den einzelnen Fischen sind besonders bei der MFO recht groß.

Tabelle 5: Zeitlicher Verlauf von alkalischer Elution und MFO bei einer BaP-Konzentration von 125 µg/g Fisch

<u>Art</u>	<u>$\bar{b}$</u>	<u>$b/\bar{b}$</u>	<u>MFO</u>
90min	-0,0565	1,310	0
Inkub.		1,327	0
	-0,056	1,134	0,08
		1,080	0
		1,009	0
		1,089	0,04
		1,272	0,032
	-0,065	1,334	0
		1,029	0,042
	-0,070	0,914	0
4 Std.	-0,0458	0,976	0,303
Inkub.		1,250	0,155
		1,048	0,147
1 Tag	-0,0565	1,204	0,29
Inkub.		1,221	0,38
	0,0625	1,088	0,40
		1,136	1,49
2 Tage	-0,0653	1,294	3,53
Inkub.		1,616	4,27
	-0,078	1,474	2,13
3 Tage	-0,0598	1,317	3,776
Inkub.		1,344	3,632
	-0,065	1,231	3,502
		1,349	3,632
4 Tage	-0,083	1,253	0,42
Inkub.		1,289	4,29
	-0,0598	1,261	4,752
		1,261	4,971
7 Tage	-0,059	1,164	1,55
Inkub.		1,008	3,29

Es ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen:

nach 90 min	$b/\bar{b} = 1,150 \pm 0,151$ MFO = $0,019 \pm 0,028$
nach 4 Std.	$b/\bar{b} = 1,091 \pm 0,142$ MFO = $0,202 \pm 0,088$
nach 1 Tag	$b/\bar{b} = 1,162 \pm 0,062$ MFO = $0,640 \pm 0,569$
nach 2 Tagen	$b/\bar{b} = 1,461 \pm 0,161$ MFO = $3,310 \pm 1,087$
nach 3 Tagen	$b/\bar{b} = 1,310 \pm 0,055$ MFO = $3,636 \pm 0,112$
nach 4 Tagen	$b/\bar{b} = 1,266 \pm 0,016$ MFO = $3,608 \pm 2,144$
nach 7 Tagen	$b/\bar{b} = 1,086 \pm 1,110$ MFO = $2,420 \pm 1,230$

Abb.3: Zeitlicher Verlauf von alkalischer Elution —————
und MFO - - - - -

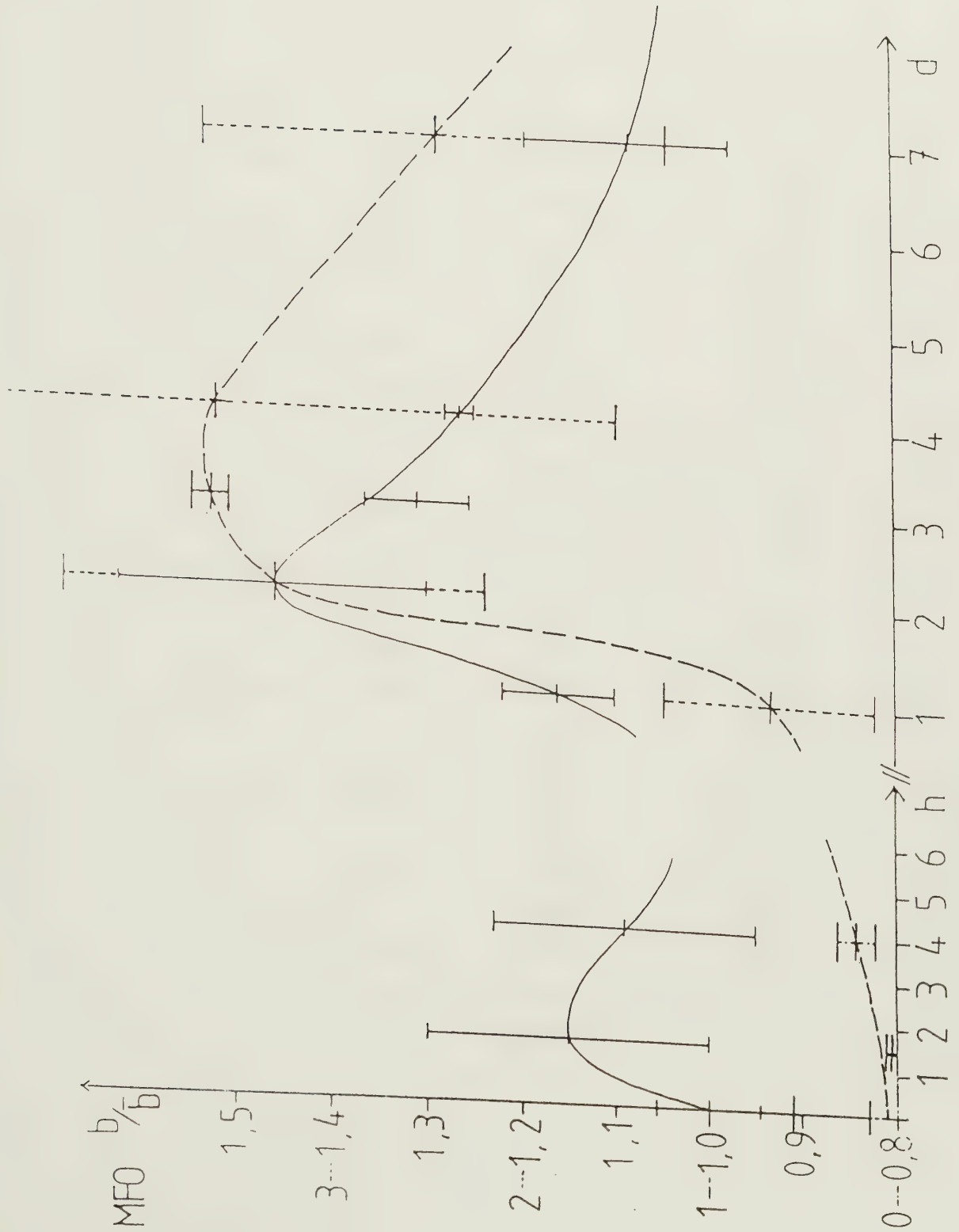


Tabelle 6: Verlauf von alkalischer Elution und MFO nach 2
Tagen Inkubationszeit in Abhängigkeit von der
Konzentration

<u>Art</u>	<u>b</u>	<u>b/b</u>	<u>MFO</u>
50 µg BaP	- 0,0627	1,116	0,485
	- 0,078	0,949	1,43
75 µg BaP	- 0,078	1,372	1,35
100 µg BaP	- 0,035	1,571	3,89
		1,514	5,26
	- 0,078	1,256	0,63
	- 0,0627	1,324	2,095
	- 0,0555	1,405	3,043
		1,429	3,29
	- 0,0518	1,583	4,116
		1,400	3,059
125 µg BaP	- 0,0653	1,294	3,53
		1,616	4,27
	- 0,078	1,474	2,13
150 µg BaP	- 0,0518	1,815	5,798
		1,747	4,505
	- 0,0627	1,494	4,333
200 µg BaP	- 0,0518	2,114	6,133
		2,124	5,493
	- 0,0555	1,748	4,70
		2,085	5,44
	- 0,0627	1,700	6,007
	- 0,035	1,486	6,64
		1,486	4,30

Es ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen:

bei 50 µg BaP $b/\bar{b} = 1,033$

MFO= 0,958

bei 100 µg BaP $b/\bar{b} = 1,435 \pm 0,115$

MFO= 3,173 $\pm$ 1,385

bei 125 µg BaP $b/\bar{b} = 1,461 \pm 0,161$

MFO= 3,310 $\pm$ 1,087

bei 150 µg BaP $b/\bar{b} = 1,685 \pm 0,169$

MFO= 4,879 $\pm$ 0,801

bei 200 µg BaP $b/\bar{b} = 1,820 \pm 0,286$

MFO= 5,530 $\pm$ 0,820

Abb.4: Verlauf von alkalischer Elution und MFO nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen in Abhängigkeit von der Konzentration

b/b —————
MFO - - - - -

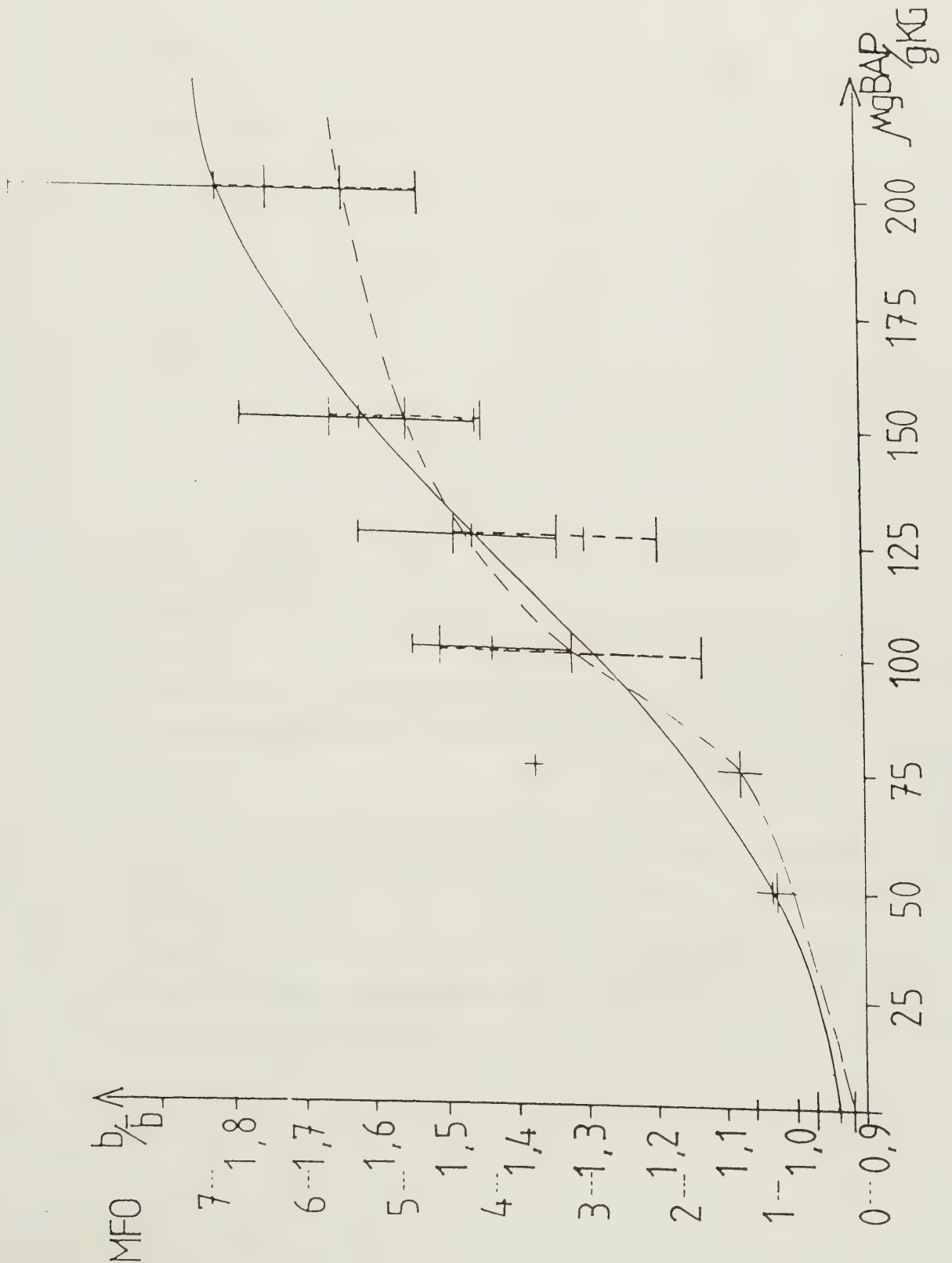


Tabelle 7: Zusammenhang zwischen alkalischer Elution und MFO
nach einer Inkubationszeit von einem Tag in
Abhängigkeit von der Konzentration

<u>Art</u>	<u>$\bar{b}$</u>	<u>$\bar{b/b}$</u>	<u>MFO</u>
100 µg BaP	-0,052	0,865	0,24
		0,885	0,19
125 µg BaP	-0,0625	1,088	0,40
		1,136	1,49
		1,204	0,29
		1,221	0,38
200 µg BaP	-0,052	0,846	0,21
		0,788	0,36

Es ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen:

Mittel der Kontrollen der Ein-Tages-Versuche: $\bar{b/\bar{b}} = 1 \pm 0,129$
MFO = $0,039 \pm 0,039$

Mittel der mit einer mittleren BaP-Konzentration von 137,5 µg/g Fisch behandelten Karpfen: $\bar{b/\bar{b}} = 1,004 \pm 0,176$
MFO = $0,445 \pm 0,430$

Ein Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten Fischen ergibt sich nach einer Inkubationszeit von einem Tag nur bei der MFO.

Somit ist zu diesem Zeitpunkt die Korrelation zwischen beiden Methoden verständlicher Weise schlecht.

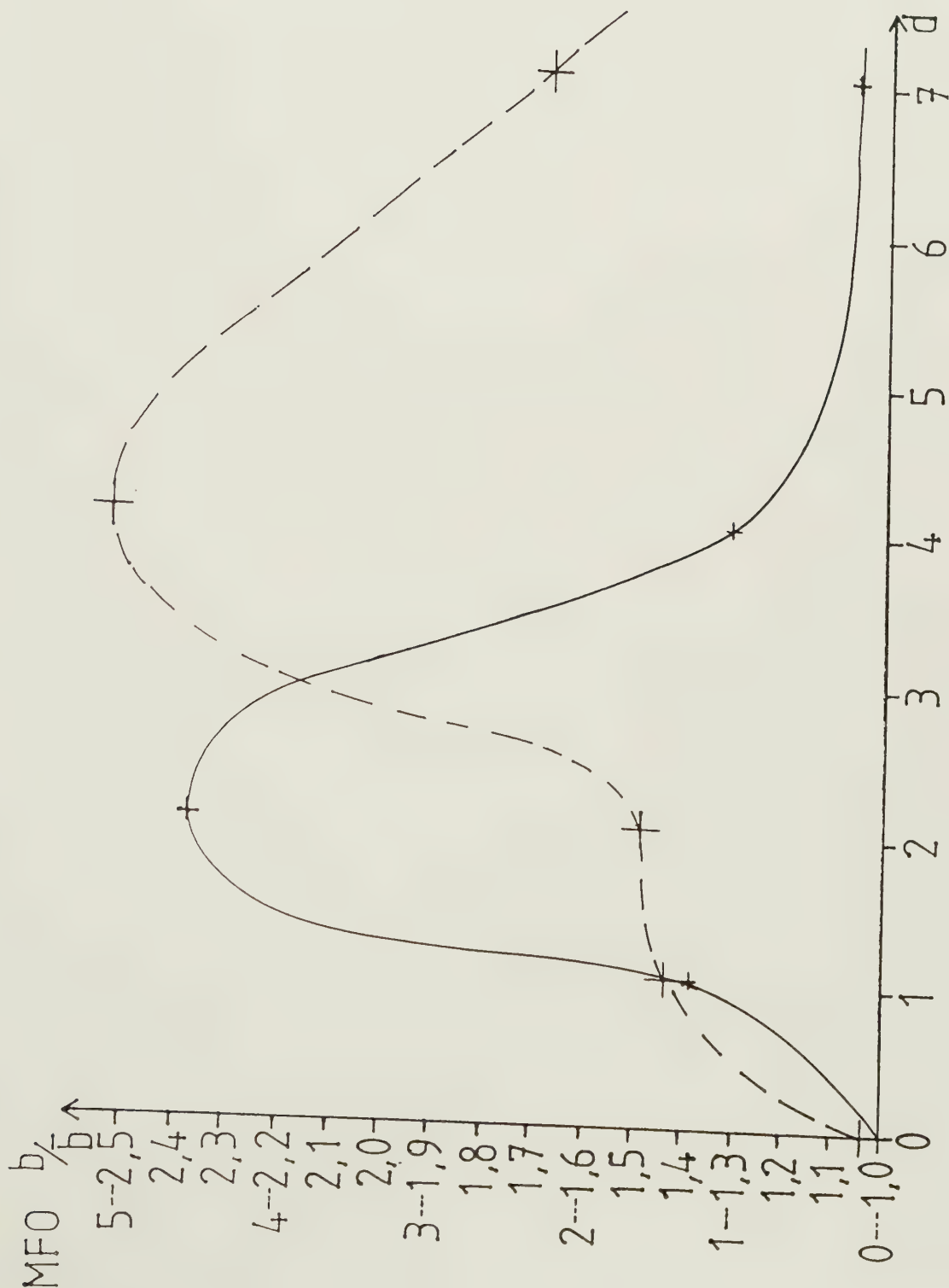
Sie beträgt $r = 0,306$ bei $n = 13$.

Tabelle 8: Zusammenhang zwischen alkalischer Elution und MFO
bei zweimalig, mit je 125 µg BaP behandelten
Karpfen

Die zweite Behandlung erfolgte 90 min vor der Leberentnahme.

<u>Art</u>	<u>$\bar{b}$</u>	<u>$\bar{b/b}$</u>	<u>MFO</u>
1 Tag	-0,065	1,371	0,26
		1,392	2,60
2 Tage	-0,0653	2,366	1,60
4 Tage	-0,083	1,325	6,61
		1,289	3,56
7 Tage	-0,059	0,992	2,51
		1,153	2,02

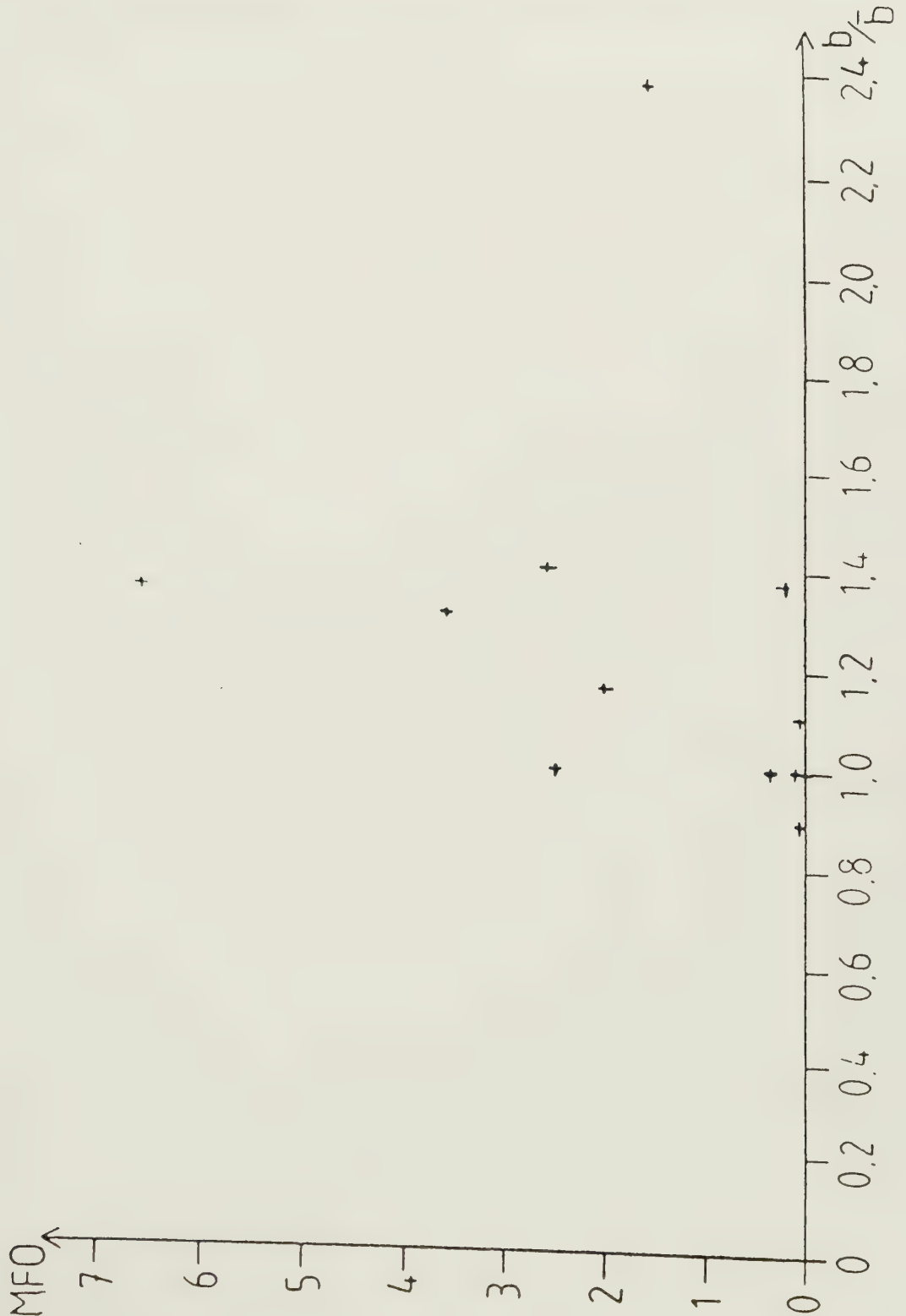
Abb.5: Zeitlicher Verlauf von alkalischer Elution ———
und MFO ----- bei zweimalig mit 125 µg BaP
behandelten Fischen



Man erkennt, daß bei beiden Methoden die höchsten Meßpunkte zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht werden, bei der alkalischen Elution etwa am 2.Tag, bei der MFO etwa am 4.Tag.

Die Korrelation zwischen beiden Methoden beträgt in diesem Fall nur $r = 0,234$ bei $n = 12$.

Abb.6: Korrelation zwischen alkalischer Elution und
MFO bei zweimalig mit je 125 µg BaP
behandelten Fischen



Betrachtet man dagegen die Korrelation der beiden Methoden bei den nur einmal behandelten Fischen, so ist diese sehr hoch. Sie beträgt $r = 0,815$ bei $n = 80$.

Noch besser wird sie, wenn man nur die Werte zum Höhepunkt der zeitlichen Verlaufskurve der alkalischen Elution, nach 2 Tagen Inkubationszeit, betrachtet: r beträgt dann $0,873$ bei $n = 32$.

Abb.7: Korrelation zwischen alkalischer Elution und MFO bei einmalig, zu unterschiedlichen Zeitpunkten, mit unterschiedlichen Konzentrationen behandelten Fischen.



4.2 Arochlor 1254

Tabelle 9: Kontrollen

<u>Art</u>	<u>$\bar{b}$</u>	<u>$\bar{b/b}$</u>	<u>MFO</u>
0	- 0,0650	1	0,151
	- 0,078	0,936	0,102
		1,064	0
	- 0,0645	1,031	0,087
		0,969	0,135
	- 0,0873	1,019	0,078
		0,979	0
	- 0,040	0,850	0,199
		1,150	0,483
	- 0,082	1	0,48
	- 0,076	1	0,256
	- 0,086	1	0,488
	- 0,070	1	0,020
	- 0,076	1	0,663
	- 0,078	1	0,085
	- 0,0515	1,068	1,115
		0,932	1,303
	- 0,047	1	0,22
		1	0,398
	- 0,0395	0,911	0,966
		1,089	1,027

Es ergeben sich folgende Mittelwerte und
Standardabweichungen: $\bar{b/\bar{b}} = 1,000 \pm 0,064$

$$MFO = 0,393 \pm 0,401$$

Tabelle 10: Verlauf der alkalischen Elution und MFO nach einer Inkubationszeit von 90 min in Abhängigkeit von der Konzentration

<u>Art</u>	<u>$\bar{b}$</u>	<u>$\bar{b/b}$</u>	<u>MFO</u>
100	- 0,078	1,019	0,034
		1	0,137
	- 0,040	1,2	0,546
		1,45	0,062
125	- 0,065	0,888	0,057
150	0,078	0,827	0
		0,667	0,047
	0,040	1,125	0,031
		1,125	0,111
175	- 0,065	0,857	0,057
200	- 0,078	0,872	0,053
		0,679	0,149
	- 0,070	0,914	0
		0,786	0,077
225	- 0,065	0,785	0,078

Es ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen:

zugehörige Kontrollen: $\bar{b/b} = 1,000 \pm 0,103$

MFO = $0,159 \pm 0,176$

bei 100 µg Arochlor: $\bar{b/b} = 1,167 \pm 0,209$

MFO = $0,195 \pm 0,238$

bei 150 µg Arochlor: $\bar{b/b} = 0,936 \pm 0,228$

MFO = $0,047 \pm 0,047$

bei 200 µg Arochlor: $\bar{b/b} = 0,813 \pm 0,104$

MFO = $0,070 \pm 0,062$

Es ist zu erkennen, daß mit zunehmender Konzentration der b/b -Wert kleiner wird.

Normalerweise spricht die Abnahme des $b/\bar{b}$ -Werts für eine abnehmende Schädigung der DNA. Doch in diesem Fall wird der Wert kleiner als der Kontrollwert.

Eine mögliche Erklärung ist die Vernetzungstheorie, auf die ich im Rahmen der Diskussion noch eingehen werde.

Da die MFO zu diesem Zeitpunkt noch keine Änderung zeigt, ist die Korrelation hier schlecht: $r = 0,305$ bei $n = 21$

Abb.8: Verlauf der alkalischen Elution und MFO nach einer Inkubationszeit von 90 min in Abhängigkeit von der Konzentration

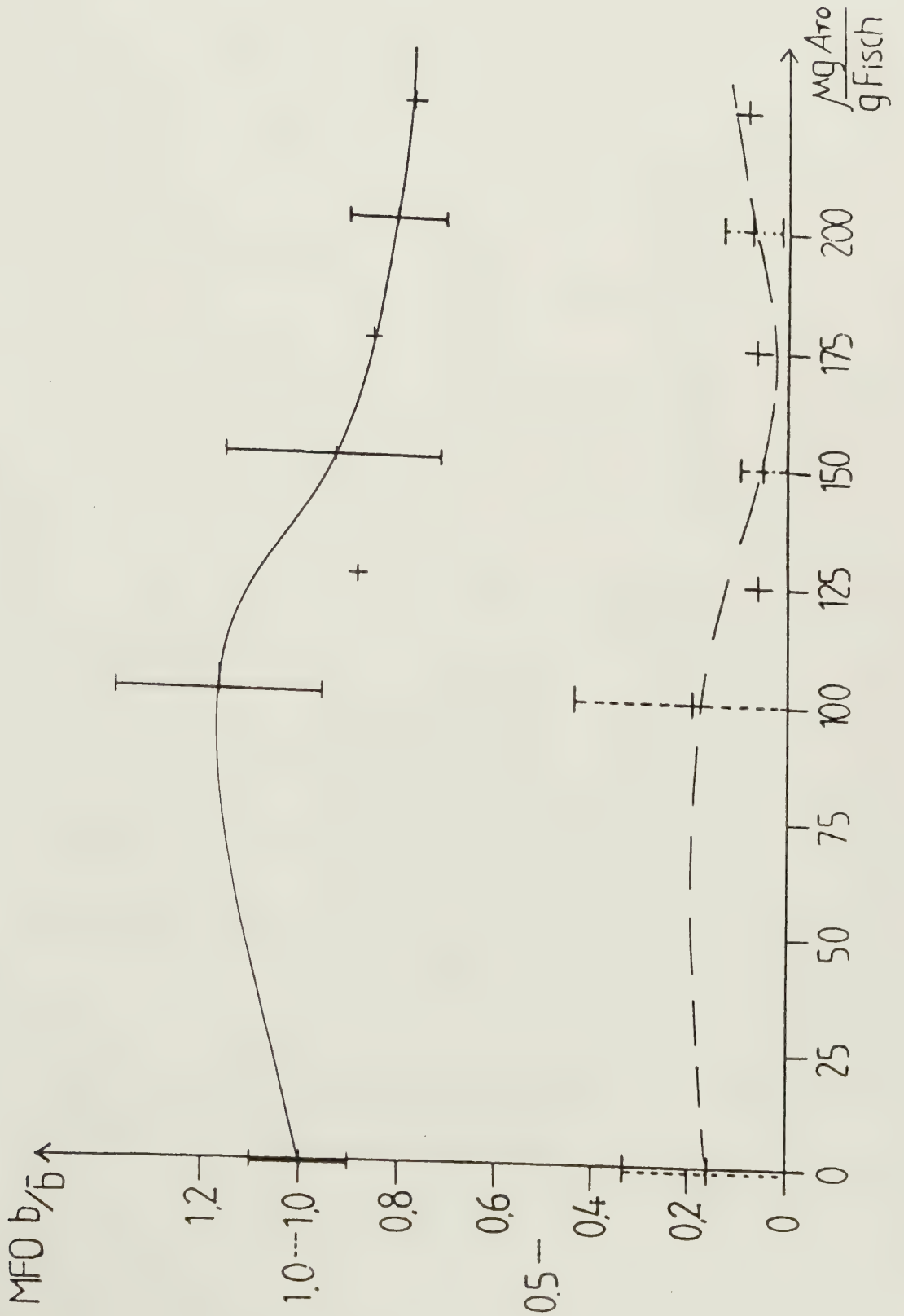


Tabelle 11: Verlauf von alkalischer Elution und MFO nach einer Inkubationszeit von einem Tag in Abhängigkeit von der Konzentration

<u>Art</u>	<u>$\bar{b}$</u>	<u>$b/\bar{b}$</u>	<u>MFO</u>
50	- 0,076	0,763	0,252
75		0,974	0,335
100		0,947	0,210
	- 0,0645	1,132	0,162
		1,054	0,171
150		1,209	0,247
		1,078	0,546
	- 0,076	0,671	0,687
200	- 0,0645	0,953	0,279
		0,946	0,486

Es ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen:

zugehörige Kontrollen $b/\bar{b} = 1,000 \pm 0,031$

MFO = $0,159 \pm 0,087$

bei 100 µg Arochlor $b/\bar{b} = 1,044 \pm 0,093$

MFO = $0,181 \pm 0,026$

bei 150 µg Arochlor $b/\bar{b} = 0,986 \pm 0,281$

MFO = $0,493 \pm 0,225$

bei 200 µg Arochlor $b/\bar{b} = 0,950 \pm 0,005$

MFO = $0,383 \pm 0,146$

Somit bei einer mittleren Konzentration von 127,5 µg Arochlor pro g Fisch $b/\bar{b} = 0,973 \pm 0,162$

MFO = $0,338 \pm 0,177$

Tabelle 12: Verlauf von alkalischer Elution und MFO nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen in Abhängigkeit von der Konzentration

<u>Art</u>	<u>$\bar{b}$</u>	<u>$\bar{b/b}$</u>	<u>MFO</u>
50	- 0,086	0,988	0,854
75		0,953	1,655
100		0,523	5,526
	- 0,047	1	0,941
		0,872	1,446
		0,532	2,528
150	- 0,086	0,930	2,576
200	- 0,076	1,079	2,635
		1,145	4,373

Es ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen:

zugehörige Kontrollen $\bar{b/b} = 1,000 \pm 0,000$

MFO = $0,442 \pm 0,185$

bei einer mittleren Konzentration von 119,44 µg Arochlor

$\bar{b/b} = 0,891 \pm 0,221$

MFO = $2,504 \pm 1,567$

Tabelle 13: Verlauf von alkalischer Elution und MFO nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen in Abhängigkeit von der Konzentration

<u>Art</u>	<u>$\bar{b}$</u>	<u>$\bar{b/b}$</u>	<u>MFO</u>
100	0,0873	0,893	0,534
		0,876	0,709
	0,082	0,720	2,51
140		0,695	3,98
150	0,0873	0,848	1,424
		0,813	1,210
200		0,487	4,677
		0,830	2,205
		0,962	3,335
	0,078	0,397	6,507

Es ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen:

zugehörige Kontrollen $b/\bar{b} = 1,000 \pm 0,016$

MFO = $0,161 \pm 0,216$

bei einer mittleren Konzentration von $154 \mu\text{g}$ Arochlor pro

g Fisch $b/\bar{b} = 0,752 \pm 0,182$

MFO = $2,709 \pm 1,922$

Tabelle 14: Verlauf von alkalischer Elution und MFO nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen in Abhängigkeit von der Konzentration

<u>Art</u>	<u>$\bar{b}$</u>	<u>$\bar{b/b}$</u>	<u>MFO</u>
100	- 0,0515	0,835	3,859
		1,146	2,797
200	- 0,0395	0,810	1,097
		0,608	4,899
		0,481	3,880

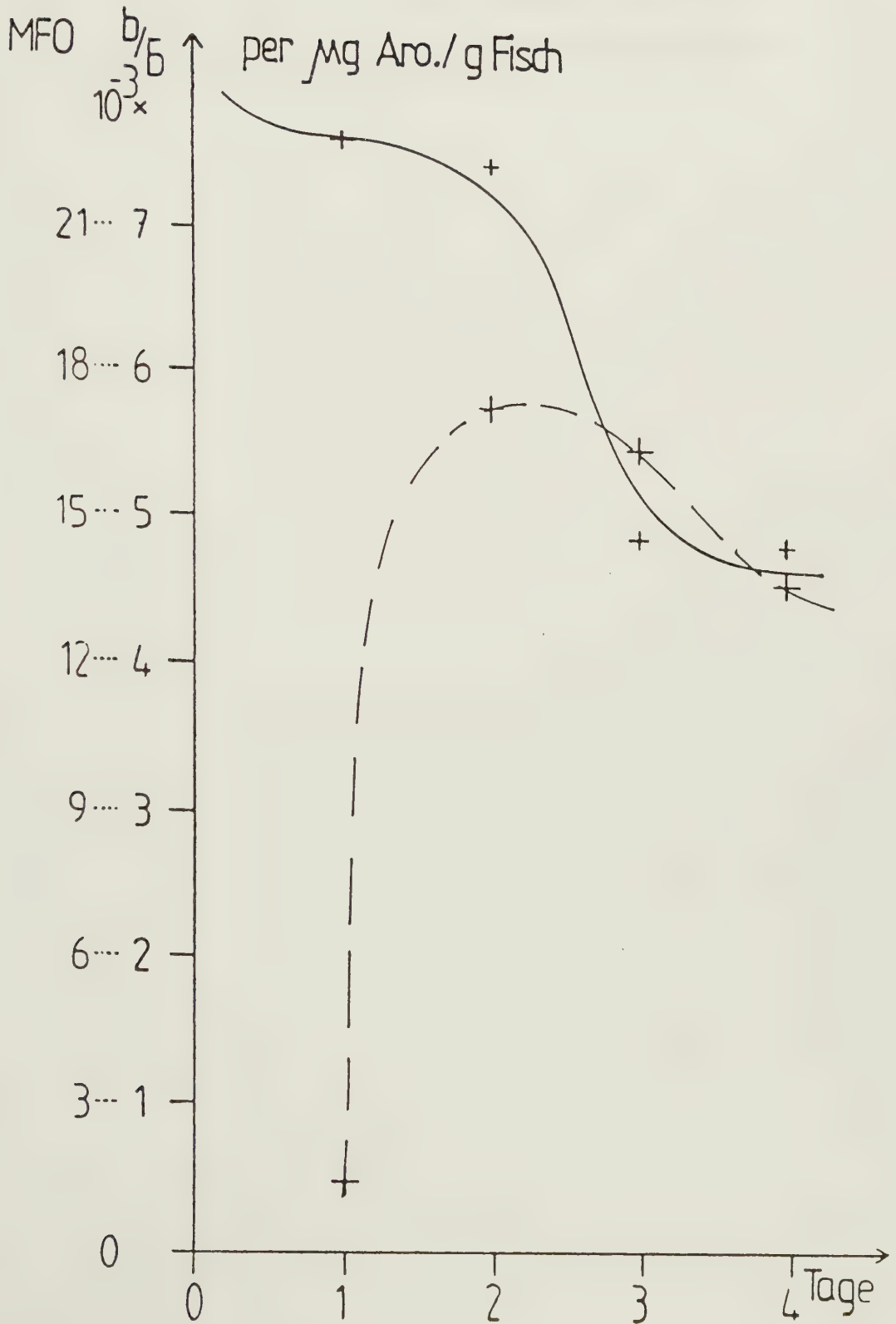
Es ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen:

zugehörige Kontrollen $b/\bar{b} = 1,000 \pm 0,091$
MFO = $1,103 \pm 0,147$

bei einer mittleren Konzentration von 160 µg Arochlor pro g Fisch
 $b/\bar{b} = 0,776 \pm 0,253$
MFO = $3,3062411,442$

Es läßt sich nun der zeitliche Verlauf von alkalischer Elution und MFO per µg Arochlor pro g Fisch darstellen:

Abb.9: Alkalische Elution ———
MFO -----



Wie schon in Abb.9 sieht man auch hier eine Abnahme der $b/\bar{b}$ -Werte gegenüber den Kontrollen. Die MFO nimmt dagegen, wie auch bei der BaP-Versuchen in Abhängigkeit von der Konzentration zu. Der Gipfel der MFO-Kurve wird jedoch bei Arochlorbelastung der Fische schneller erreicht, nämlich schon ca. am zweiten Tag. Durch die Abnahme der $b/\bar{b}$ -Werte ergibt sich für den Korrelationskoeffizienten einen negativen Wert: $r = - 0,5423$ bei $n = 70$.

Abb.10: Korrelation zwischen alkalischer Elution und MFO bei Karpfen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten , einmalig mit unterschiedlichen Arochlorkonzentrationen behandelt wurden.



Verzichtet man bei der Berechnung der Korrelation auf die Werte bei 90 min Inkubationszeit, so wird diese deutlich besser: $r = -0,6473$ bei $n = 49$, da zu diesem Zeitpunkt bei der MFO noch keine Änderungen eingetreten sind.

4.3 Methylcholanthren

Tabelle 15: Kontrollen

<u>Art</u>	<u>$\bar{b}$</u>	<u>$\bar{b/b}$</u>	<u>MFO</u>
0	-0,0618	1	0,445
	-0,072	0,972	0
		1,028	0,158
	-0,0447	1,477	0,336
		0,783	0,260
		0,738	0
	-0,0733	1,023	0,112
		0,975	0,340
	-0,0715	1	0,043
	-0,0713	1,059	0
		0,940	0,088
	-0,0688	0,996	0,205
		1,003	0
	-0,054	1	0,937

Es ergeben sich folgende Mittelwerte und
Standardabweichungen: $b/\bar{b} = 1,000 \pm 0,165$
MFO = $0,209 \pm 0,256$

Tabelle 16: Alkalische Elution und MFO bei einer Inkubationszeit von 90 min

<u>Art</u>	<u>b</u>	<u>b/b</u>	<u>MFO</u>
120 µg Met.	-0,072	1,042	0,051
		1,014	0
	-0,0733	0,992	0,183
		0,924	0,198

Es ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen: $b/\bar{b} = 0,993 \pm 0,050$
 $MFO = 0,108 \pm 0,098$

Tabelle 17: Verlauf von alkalischer Elution und MFO nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen in Abhängigkeit von der Konzentration

<u>Art</u>	<u>b</u>	<u>b/b</u>	<u>MFO</u>
100 µg Met.	-0,0715	0,860	0,993
	-0,0540	1,037	1,841
	-0,0715	0,955	1,454
	-0,0540	1,130	3,762
	-0,0715	1,003	2,995
	-0,0540	0,963	4,879
	-0,0715	0,955	3,026
	-0,0540	1,463	3,326
	-0,0715	1,011	3,803
	-0,0715	0,899	6,033

Tabelle 18: Alkalische Elution und MFO bei einer Inkubationszeit von 3 Tagen

<u>Art</u>	<u>$\bar{b}$</u>	<u>$\bar{b/b}$</u>	<u>MFO</u>
120 µg Met.	-0,0618	0,555	4,792
		0,563	1,114
	-0,0720	1,083	1,103
		1,181	0,995
	-0,0733	0,918	4,489
		1,055	3,906

Es ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen: $b/\bar{b} = 0,893 \pm 0,272$
MFO = $2,567 \pm 2,053$

Tabelle 19: Alkalische Elution und MFO nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen und einer weiteren von 90 min bei zweimaliger Gabe der Substanz

<u>Art</u>	<u>$\bar{b}$</u>	<u>$\bar{b/b}$</u>	<u>MFO</u>
150 µg Met.	-0,0447	1,588	7,839
zweimalig		1,387	4,475
		1,342	6,502

Es ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen: $b/\bar{b} = 1,439 \pm 0,131$
MFO = $6,272 \pm 1,694$

Tabelle 20: Verlauf von alkalischer Elution und MFO bei einer Inkubationszeit von 4 Tagen in Abhängigkeit von der Konzentration

<u>Art</u>	<u>b</u>	<u>b/b</u>	<u>MFO</u>
100 µg Met.	-0,0713	1,014	2,812
		1,028	2,318
	-0,0688	0,978	2,989
		1,055	1,699
	-0,0713	1,042	2,935
		0,992	3,366
	-0,0688	1,057	3,035
		0,974	3,534

Es ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen:

bei 100 µg Met. $b/\bar{b} = 1,019 \pm 0,032$

MFO = $2,455 \pm 0,578$

bei 200 µg Met. $b/\bar{b} = 1,016 \pm 0,040$

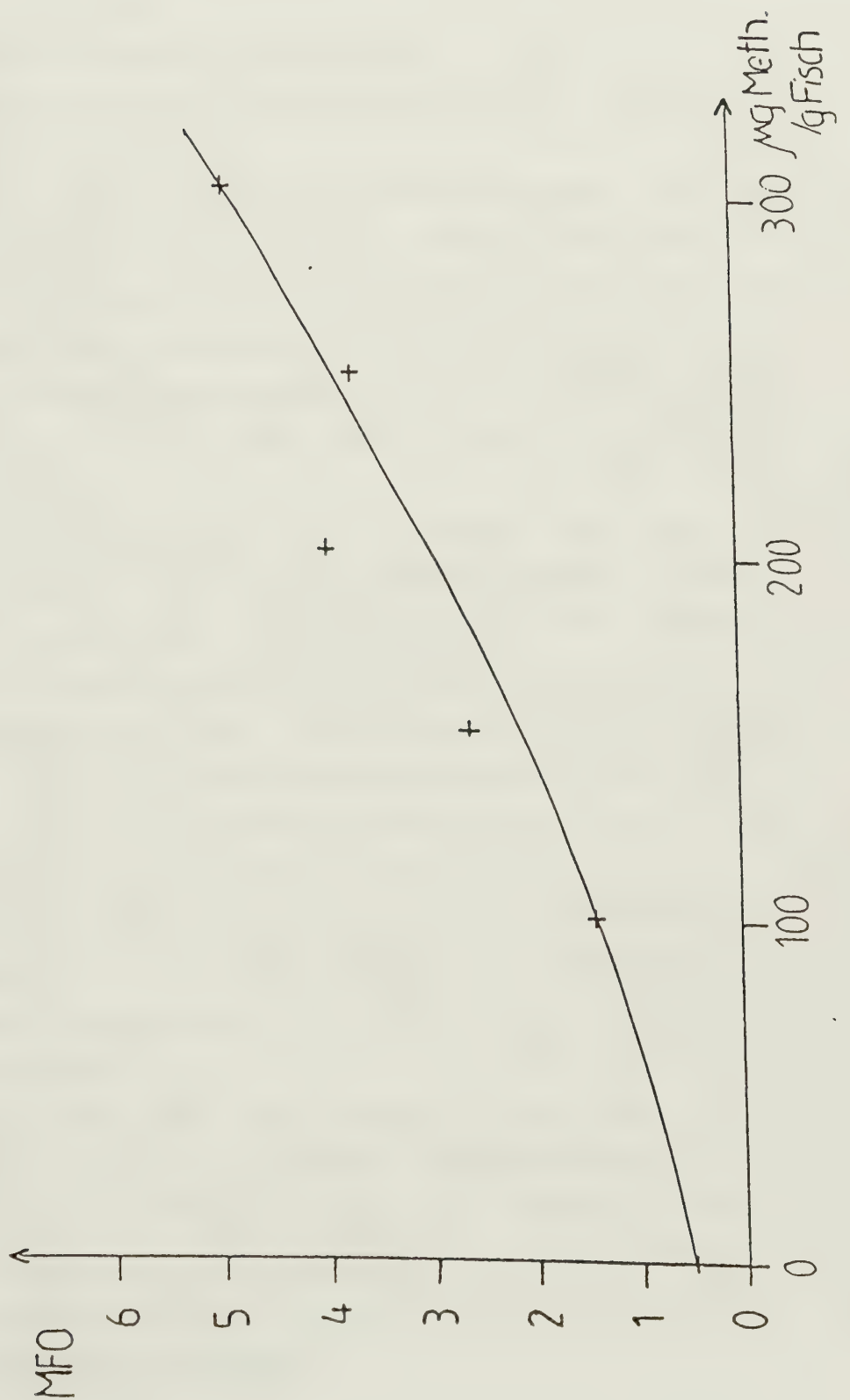
MFO = $3,215 \pm 0,282$

In den Änderungen der $b/\bar{b}$ -Werte läßt sich nach Inkubation mit Methylcholanthren keine Regelmäßigkeit erkennen.

Die MFO steigt dagegen wieder mit zunehmender Konzentration stark an.

Die Korrelation beider Methoden für Methylcholanthren ist somit schlecht. Sie beträgt $r = 0,2999$ bei $n = 45$.

Abb.12: MFO nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen in Abhängigkeit von der Konzentration



5. D i s k u s s i o n

5.1 Die "alkalische Elution"

Mit der alkalischen Elutionstechnik von Kohn et al. (1974) erfaßt man Einzel-, Doppelstrangbrüche und alkalilabile Stellen.

Mit der Methode lassen sich DNA-Schädigungen sowohl im Zellkulturversuch (Emmig C.; 1988) als auch im In-vivo-Versuch (Höhn-Bentz J. et al.; 1983, Stüber J.J. et Zahn R.K.; 1985) nachweisen.

Es läßt sich mit der Methode, wie es auch Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, ein sogenannter "schneller Effekt" und ein Effekt, der erst nach Tagen einsetzt, zeigen (Zahn R.K.; 1985).

Die Methode hat jedoch auch Nachteile: Man kann mit Sicherheit nur einen Teil der Schädigung messen, da sofort nach Beginn der DNA-Schädigung auch die diversen Reparaturmechanismen in Gang gesetzt werden.

Solche Reparaturmechanismen sind die Photoreaktivierung (Sutherland B.M.; 1981), die Excisionsreparatur (Thielmann H.W.; 1984), die Postreplikationsreparatur (Lavin M.F.; 1978), die Adaptionsreparatur (Dempfle B. et al.; 1982), die SOS-Reparatur (Witkin E.M.; 1974).

Diese Reparatursysteme kennt man sowohl bei Bakterien als auch, mit gewissen Abwandlungen, bei Säugetierzellen (Hanawalt P.C. et al.; 1982, Friedberg E.C. et al.; 1981).

Ein Teil der Schädigung ist also zum Zeitpunkt der Messung bereits behoben.

Ein weiterer Teil der Schäden wird durch die Reparaturvorgänge in nicht meßbare Schäden umgewandelt: Der SOS-Reparaturmechanismus bewirkt zum Beispiel gehäuft fehlerhafte Nukleotidsequenzen, sogenannte error-prone-repair, die Mutationsrate steigt hierdurch stark an, die fehlerhaften Nukleotidsequenzen sind jedoch mit der Elutionstechnik nicht meßbar.

Nicht zu vernachlässigen sind auch die Zahl der artifiziell zusätzlich herbeigeführten Schäden: Durch ultraviolette Strahlung entstehen auch nach Beginn des Versuchs noch Schäden an der DNA (Bradley M.O. et al.; 1978). Dieser Faktor ist ein wesentlicher Erklärungsansatz der Genese von Hauttumoren (Hecker E.; 1977). Um diese Fehlerquelle zu minimieren, habe ich versucht die UV-Bestrahlung während des Versuchs weitgehendst zu vermeiden. Desweiteren habe ich bei jedem Versuchsansatz nicht geschädigte Kontrollen zum Vergleich mituntersucht.

Ein darüberhinaus nicht zu vernachlässigender Faktor für die Beeinträchtigung der Elutionsmethode ist die Entstehung von DNA-Vernetzungen, deren Genese noch nicht völlig geklärt ist (Fornace A.J. et Little J.B.; 1979). Es sind DNA-Schäden, die die Elutionsgeschwindigkeit verlangsamen, b wird kleiner, und somit wird die Intaktheit der DNA simuliert.

5.2 Die Aktivität der mischfunktionellen Oxygenasen

Stellvertretend für die Gruppe der mischfunktionellen Oxygenasen, ein wesentliches Entgiftungssystem der menschlichen Körpers, in dem das Cytochrom P 450 eine bedeutende Rolle spielt (Yang S.K., Deutsch J.; 1978), bestimmt man im MFO-Test nach Nebert und Gelboin (1969a,b) die Aktivität der Benzo-a-pyren-Monooxygenase durch Messung der 3-OH-BaP-Äquivalente (siehe Seite 27).

Eine Aufgabe der MFO ist es, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe wasserlöslich und somit ausscheidbar zu machen. Durch Belastung mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe läßt sich das Enzymsystem langfristig induzieren. Somit gelingt es mit dieser Untersuchungsmethode Belastungen eines Organismusses mit genotoxischen Substanzen noch einige Zeit nach Eintritt der Schädigung zu erfassen, wesentlich länger als zum Beispiel bei der alkalischen Elutionsmethode.

Es gibt jedoch unter den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen solche, die erst durch die Oxidation und weitere Metabolisierung durch mischfunktionelle Oxygenasen zu ultimatzen Karzinogenen werden (Oesch F.; 1977).

Hier genau liegt das Problem der Methode bei Einsatz zur Untersuchung auf karzinogene Aktivität: Auf der einen Seite sind die mischfunktionellen Oxygenasen ein wichtiger Faktor für die Entstehung ultimatzer Karzinogene, auf der andern Seite ist das System ein wesentliches Entgiftungssystem, verkleinert somit die entstehenden Schäden.

Es ist daher anstrebenswert, den MFO-Test mit einer Methode zu kombinieren, die die Schädigung des Gens direkt mißt, so die alkalische Elutionstechnik.

Durch Kombination der beiden Methoden kann man somit die Aussagekraft der Ergebnisse wesentlich erhöhen.

5.3 Benzo-a-pyren

Benzo-a-pyren ist eine im Ames-Test als karzinogen und mutagen beschriebene Substanz (McCann et al.; 1975). Ein für die Karzinogenität bedeutender Faktor ist die Eigenschaft, DNA-Einzelstrangbrüche zu erzeugen. Diese Eigenschaft ist in der Literatur mehrfach beschrieben (z.B. Batel R., Bihari N.; 1983).

Auch die Ergebnisse meiner Arbeit drücken diese Eigenschaft aus: Es zeigt sich eine Abhängigkeit der DNA-Schädigung durch Benz-a-pyren sowohl von der Zeitperiode der Schädigung (siehe Abb.3 Seite 34) als auch von der Konzentration der Substanz (siehe Abb.4 Seite 36).

Nachvollziehbar ist in der vorliegenden Arbeit auch der von Höhn-Bentz J. 1983 erstmalig beschriebene sogenannte "schnelle Effekt": 60-90 Minuten nach Eintritt der Schädigung sind erstmals DNA-Strangbrüche meßbar. Wenige Stunden später läßt sich keine Schädigung mehr nachweisen. Als Erklärung hier für wird eine vorübergehende Hemmung der Reparatursysteme durch Benz-a-pyren diskutiert (Emmig C; 1988).

Danach nimmt die Schädigung wieder zu und erreicht im Versuch mit Karpfen nach 2 Tagen den Schädigungshöhepunkt (siehe Abb.3 Seite 34), um dann allmählich abzufallen.

Ein ähnlicher "schneller Effekt" läßt sich im MFO-Test nicht nachvollziehen. Die spezifische Aktivität der Benz-a-pyren-Monooxygenase steigt allmählich an, erreicht später als die DNA-Strangbruchanzahl ihren Höhepunkt und fällt dann langsamer als diese ab.

In Abhängigkeit von der Konzentration verhalten sich MFO und alkalische Elution ähnlich:

Beide steigen konzentrationsabhängig an. In höheren Konzentrationsbereichen von Benz-a-pyren wird dieser Anstieg zunehmend langsamer.

Dieser Sachverhalt drückt sich auch im Korrelationskoeffizient aus: r beträgt bei unterschiedlichen Konzentrationen, aber gleichen

Inkubationszeiten 0,873 bei $n=32$ Fischen. Die Korrelation zwischen beiden Methoden ist also unter Vorgabe einer bestimmten Inkubationszeit recht gut.

Einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die vorliegende Arbeit für die beiden Methoden im Bezug auf die Substanz Benz-a-pyren zeigt auch die Arbeit von Zahn R.K. et al. (1985).

Auffallend sind auch die Ergebnisse der Versuche mit zweimaliger Gabe von BaP. Sie sind auf Grund der in diesem Fall niedrigen Versuchsanzahl nicht repräsentativ, deuten jedoch sehr wohl eine Richtung an. Hier sei es nur als Möglichkeit für weitere Untersuchungen diskutiert:

Die Untersuchungsbedingungen waren so, daß man vom Fall des "schnellen Effekts" bei vorgeschädigten, MFO-induzierten Fischen ausgehen kann. Variabel war der Inkubationszeitraum der Vorschädigung (Siehe Seite 39, 40). Nach den vorhergehend diskutierten Ergebnissen war somit die MFO-Aktivität variabel, sowie die Anzahl bereits vorhandener DNA-Strangenbrüche. Es zeigte sich, daß zum Zeitpunkt mittlerer MFO-Aktivität und maximaler Strangenbruchzahl auch hier der höchste Meßpunkt für DNA-Schäden festzustellen war.

Dieses spricht für den Erklärungsansatz der Reparaturhemmung für den "schnellen Effekt":

Durch die bereits vorliegenden DNA-Schäden ist die Beanspruchung der Reparatursysteme so groß, daß sich die kurzfristige Hemmung besonders deutlich auswirkt.

Doch wie bereits im Vorangegangenen erwähnt, bedarf dieser Sachverhalt weiterer Experimente zur Klärung.

Benz-a-pyren ist also eine Substanz für die beide Untersuchungsmethoden aussagekräftige Ergebnisse liefern. Benz-a-pyren-Schäden lassen sich durch die Kombination beider Methoden gut bestimmen.

5.4 Arochlor 1254

Arochlor ist eine Substanz, deren karzinogene und mutagene Potenz umstritten ist (siehe Seite 15).

Als sicher kann man jedoch die Eigenschaft betrachten, daß Arochlor mischfunktionelle Oxigenasen induziert. Dies zeigen zum Beispiel die Arbeiten von Miranda C.L. et al.(1987) und Buchmann A. et al.(1986).

Vorbehandlung von Ratten und Hamstern mit Arochlor führt dazu, daß z.B. die Mutagenität von 2-Naphthylamin ansteigt (Tong S. et al.; 1986).

Eine hohe Induzierbarkeit der MFO durch Arochlor zeigt sich auch bei Karpfen. Der Höhepunkt der Induktion ist schneller erreicht als bei Benz-a-pyren, nämlich nach bereits 2-3 Tagen. Die Aktivität der MFO nimmt ebenfalls mit steigender Konzentration zu (siehe Seite 49-53).

Ganz anders als bei Benz-a-pyren verhält es sich mit der alkalischen Elution bei Arochlor 1254.

Schon beim "schnellen Effekt" deutet sich diese Änderung an: b/b wird mit steigender Konzentration kleiner als 1.

Ebenso verhält es sich bei den Versuchen mit längeren Inkubationszeiten: b der geschädigten Tiere wird vom Betrag her kleiner als b der Kontrollen.

Dies könnte den Gedanken nahe legen, daß bei mit Arochlor 1254 behandelten Fischen weniger DNA-Strangbrüche und alkalilabile Stellen in der Leber-DNA entstehen als bei den unbehandelten Kontrollen. Dies wiederum würde bedeuten, daß Arochlor 1254 das genetische Material stabilisieren würde, die DNA vor Schäden schützen würde.

Diesen Gedanken halte ich jedoch für äußerst zweifelhaft.

Ein weiterer Erklärungsansatz wäre folgender:

Die Schädigung durch Arochlor ist so groß, daß bereits während der Waschphase der größte Teil der DNA vom Filter gewaschen wird. Die restliche, weitgehend intakte DNA würde nun sehr langsam vom Filter eluiert. Dieses würde jedoch bedingen, daß die gemessenen Gesamtfluoreszenz pro geschädigtem Fisch sehr gering ist, da ein großer Teil der

DNA bei der Messung nicht erfaßt würde.

Bei meinen Versuchen war das jedoch nicht der Fall. Die Gesamtfluoreszenzen der geschädigten Tiere entsprachen in etwa denen der Kontrolltiere.

Ich gehe davon aus, daß das betragsmäßige Kleinerwerden der b-Werte auf DNA-Vernetzungen durch Arochlor 1254 zurückzuführen ist.

Solche DNA-Vernetzungen wurden bereits mehrfach beschrieben. Eine Möglichkeit zur Erklärung der DNA-Vernetzungen ist die Bindung chemischer Karzinogene oder ihrer Abbauprodukte direkt an die DNA, wie es zum Beispiel für N-Methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine beschrieben ist (Miller J.A.; 1970, Fuchs R. et Duane M.; 1972).

Eine andere Möglichkeit ist die Bildung von Vernetzungen durch Proteinbrücken, wie sie Fornace A.J. (1979) beschreibt. Weitere Substanzen, von denen gezeigt wurde, daß sie zu DNA-Vernetzungen führen, sind N-Acetoxy-2-acetylaminofluorene (Kubinsky H.; 1976), 7,12-Dimethylbenz-a-anthracene, aber auch Röntgen-Strahlung (Fornace A.J.; 1977).

Die alkalische Elutionstechnik in der von mir durchgeführten Weise ist jedoch nicht die geeignete Methode DNA-Vernetzungen zu quantifizieren. Doch weisen die Ergebnisse sehr wohl in die Richtung, daß Arochlor 1254 als mutagene Substanz einzuordnen ist.

Mit beiden Methoden ist eine Belastung des Organismus mit Arochlor zu erfassen.

Mit einigen Abänderungen der beschriebenen Technik die alkalischen Elution wäre es möglich die entstehende Schädigung genauer zu messen.

5.5 Methylcholanthren

Wie bereits zuvor beschrieben, ist Methylcholanthren ein potenter Induktor für mischfunktionelle Oxygenasen (siehe Seite 17).

Dieses gilt, wie es die vorliegenden Ergebnisse zeigen, auch für Karpfen: In Abhängigkeit von der Konzentration steigt die Aktivität der mischfunktionellen Oxygenasen deutlich an

Unerwartet sind die Ergebnisse der alkalischen Elution bei den Methylcholanthren-Versuchen:

Die Substanz wird im Ames-Test als mutagen und karzinogen beschrieben (McCann J. and Ames B.N.; 1975). Auch andere Autoren beschreiben die Karzinogenität der Substanz.

In den vorliegenden Versuchsergebnissen ist es jedoch nicht möglich eine Aussage über die DNA-Schädigung zu machen. Es läßt sich keinerlei Regelmäßigkeit in den Ergebnissen erkennen:

Einerseits finden sich nach Behandlung mit Methylcholanthren b/b-Werte, die deutlich kleiner sind als 1, andererseits finden sich unabhängig von Steigerung der Konzentration und Veränderung der Inkubationszeit b/b-Werte, die deutlich größer sind als 1.

Dieses könnte also bedeuten, daß sowohl DNA-Vernetzungen als auch DNA-Strangbrüche in hoher Zahl auftreten. Konzentrations- und Inkubationszeit-unabhängig überwiegen einmal die Strangbrüche und alkalilabilen Stellen, das andere Mal die Vernetzungen.

In diesem Fall scheint die alkalische Elutionstechnik keine geeignete Untersuchungsmethode zu sein.

Es müßte gelingen, die DNA-Vernetzungen zu lösen und somit eine Maßzahl für die DNA Strangbrüche zu erhalten.

Dies ist eine Aufgabe, die von einem Mitglied unserer Arbeitsgruppe weiter verfolgt wird.

5.6 Allgemeines

Diese Arbeit wurde im Rahmen der Arbeitsgruppe "Rheinwasser" am Institut für physiologische Chemie der Universität Mainz erstellt. Im Rahmen dieser Arbeitsgruppe wird eine Pilotstudie zur Erfassung des "ökologischen Schädigungspotentials" (öSP) im Rheinwasser durchgeführt.

In diesem Zusammenhang sind die vorliegenden Experimente zu werten.

Durch Kombination von alkalischer Elution und MFO gelingt es in vivo vorausgegangene Belastungen eines Organismuses mit verschiedenen, nicht bekannten, chemischen Noxen nachzuweisen. Um die Noxe identifizieren zu können, bedarf es vieler standardisierter Vergleichsuntersuchungen.

Auf Grund der hohen Schwankungen zwischen den Einzelindividuen selbst eine Spezies braucht man sehr hohe Fallzahlen, um signifikante Aussagen machen zu können.

Dies zu erreichen war ein Ziel unserer Arbeit durch ständige Verbesserung und Fortentwicklung der Methoden.

Zu Beginn meiner experimentellen Arbeit war insbesondere die alkalische Elutionsmethode eine äußerst zeitintensive Technik. Durch inzwischen erreichte weitgehende Automatisierung dieser Methode wird es in Zukunft möglich sein, in kürzerer Zeit hohe Fallzahlen zu erreichen und somit hat die Methode weiter an Attraktivität gewonnen.

6 . Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Arbeit stellt zwei Methoden zur Erfassung von Schadstoffbelastung von Organismen, hier Karpfen, vergleichend dar: die alkalische Elutionstechnik und den MFO-Test.

Als chemische Noxen wurden Benz-a-pyren, Methylcholanthren und Arochlor 1254 gewählt.

Mit dem MFO-Test konnte für alle 3 Substanzen eine Induzierbarkeit der mischfunktionellen Oxigenasen bei Karpfen gezeigt werden.

Die Ergebnisse der alkalischen Elution waren nicht so einheitlich.

Eindeutig ließen sich mit der "alkalischen Elutionstechnik" für Benzo(a)pyren DNA-Schäden im Sinne von Einzelstrang-, Doppelstrangbrüchen und alkalilabilen Stellen nachweisen.

Die Ergebnisse von Arochlor 1254 zeigen, daß als Form der Schädigung die Vernetzungen wohl überwiegen.

Im Falle mit Methylcholanthren konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden. Es bedarf in diesem speziellen Fall noch einiger Verbesserungen der Methode, um signifikante Aussagen machen zu können.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Kombination beider Methoden ein gutes System zur Erkennung genotoxischer Schäden darstellt.

7 . L i t e r a t u r

Acker L., Schulte E.:

Über das Vorkommen chlorierter Kohlenwasserstoffe im menschlichen Fettgewebe und Humanmilch.

Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 60, pp 385; 1970

Ames B.N.:

Identifying Environmental Chemicals Causing Mutations and Cancer.

Science 204, pp 587-593; 1979

Ames B. N., Durston W. E., Yamasaki E., Lee F. D.:

Carcinogens are Mutagens: A simple test combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection.

Pro. Natl. Acad. Sci. 70, pp 2281-2285; 1973

Ames B.N., McCann J., Yamasaki E.:

Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test.

Mutat. Res. 32, pp 347-364; 1975

Bastjun R.C., Whitlock J.P., Miller H., Rapp H.J., Gelboin H.V.:

Aryl hydrocarbon Benzo(a)pyrene Hydroxylase in Human peripheral Blood Monocytes. Nature 250, pp 664-665; 1974

Batel R., Bihari N.:

DNA Damage by Benzo(a)pyrene in the Liver of Mosquito fish Gambusia affinis.

The Science of the Total Environ. 42, pp 275-283; 1983

Baum E.J.:

Occurrence and Surveillance of Polycyclic Hydrocarbons.

Polycyclic Hydrocarbons and Cancer, Vol 1, Academic Press New York, pp 45-70; 1978

Bennett B.G.:

Exposure of man to environmental PCBs and exposure commitment assessment.

Science Total Environ. 29, pp 101-111; 1983

Bercovici B., Wassermann M., Cucos S., Ron M., Wasserman M., Pines A.:

Serum levels of polychlorinated Biphenyls and some organochlorine Insecticides in women with recent and former missed abortions.

Environmental Research 30, pp 1169-1174; 1983

Binder R.L., Lech J.J.:

Xenobiotics in gametes of Lake Michigan lake trout (*Salvelinus namaycush*) in duce hepatic monooxygenase activity in their offspring.

Fundamental and Applied Toxicology 4, pp 1042-1054; 1984

Birnboim H.C.:

Importance of DNA strand-break damage in tumorpromotion.

In: Radioprotectors and Anticarcinogens, edit by Nygaard P.F., Simic M.G., Hauber J.V., Academic Press New York, pp 539-557; 1983

Björseth A., Lunde G., Lindskog :

Longrange transport of polycyclic aromatic hydrocarbons.

Atmos. Environ. 13, pp 45; 1979

Borneff J.:

Hygiene, 4.Aufl. Thieme Verlag, pp 193; 1982

Bradley M.O., Leonard C., Erickson L.C. and Kohn K.W.:

Non-enzymatic DNA Strandbreaks induced in Mammalian Cells by fluorescent light.

Biochim. Biophys. Acta 520, pp 11-20; 1978

Brockhaus A., Röncke G., Weisz H.:

Benzpyrenpegel des Luftstaubs in der BRD.

Deutsche Forsch.-Gemeinschaft, Bonn-Bad Godesberg, Komm.
Erforsch. Luftverunreinigung Mitt XIII; 1975

Buchmann A., Kunz W., Wolf C.R., Oesch F. and Robertson
L.W.:

Polychlorinated biphenyls, classified as either
phenobarbital- or 3-methylcholanthrene-type inducers of
cytochrome P-450, are both hepatic tumor promoters in
diethylnitrosamine-initiated rats.

Cancer Lett. 32(3), pp243-253; 1986

Byus C.V., Costa M., Spies I.G., Brodie B.B., Russell D.H.:

Activation of 3':5'-cyclic Amp-dependent protein kinase
and induction of ornithine decarboxylase as early events
in induction of mixed-function oxygenases.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, pp 1241; 1976

Cantrell E.T., Warr G.A., Busbee D.L., Martin R.R.:

Induction of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase in human
pulmonary alveolar macrophages by cigarette-smoking.

J. Clin. Invest 52, pp 1881-1884; 1973

Davies J.M., Bell J.S., Houghton C.:

A comparison of the levels of hepatic arylhydrocarbon
hydroxylase activities in cohosalmon (*Oncorhynchus*
kisutch) exposed to petroleum hydrocarbons.

Comp. Biochem. Physiol. 79, pp 337-341; 1984

Demple B., Jacobson A., Olsson M., Robins P. and Lindahl T.:

Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem. 257, pp 13776-13780; 1982

DePierre J.W., Ernester L.:

The metabolism of polycyclic hydrocarbons and its
relationship to cancer.

Biochim. Biophys. Acta 473, ppl49; 1978

Deutsch J., Lentz J.C., Yang S.K., Gelboin H.V., Chang Y.L.,
Vatsis K.P., Coon M.J.:

Regio- and stereoselectivity of various forms of purified
cytochrome P-450 in the metabolism of benzo(a)pyrene and
(-)trans-7,8-dihydro-benzo(a)pyrene as shown by product
formation and binding to DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, pp 3123-3127; 1978

Doll R., Peto R.:

Mortality in relation to smoking 20 years observations on
male british doctors.

Brit. med. J. II/6051, pp 1525; 1976

Doll R., Peto R.:

The causes of Cancer: Quantitative estimates of Avoidable
Risks of Cancer in the United States today.

J. Natl. Cancer Inst. 66, pp 1192-1198; 1981

Emmig C.:

Effekt von Benzo(a)pyrene auf die Reparatur von
alkylierter DNA in Friend-Erythroleukemia Zellen.

Inauguraldissertation, Johannes-Gutenberg-Uni, Mainz;
1988

Fiedberg E.C., Bonura T., Love J.D., McMillan S., Radanay
E.H. and Schultz R.A.:

The Repair of DNA damage: Recent Developments and new
Insights.

J. Supramol. Struct. Cell. Biol. 16, pp 91-103; 1981

Fornace A.J., Fornace Jr. and Little J.B.:

DNA crosslinking induced by X-rays and chemical agents.

Biochim. Biophys. Acta 477, pp 95-103; 1977

Fornace A.J., Fornace Jr. and Little J.B.:

DNA-Protein Cross-Linking by Chemical Carcinogens in
Mammalian Cells.

Cancer Research 39, pp 704-710; 1979

Fuchs R. and Duane M.:

Physical studies on DNA after covalent binding of a carcinogen. *Biochemistry* 11, pp 2659-2666; 1972

Gamper H.B., Tung A.S.-C., Sraub K., Bartholomew J.C., Calvin M.:

DNA Strand Scission by Benzo(a)pyrene Diol Epoxides. *Science* 197, pp 671-674; 1977

Greenberg L. et al.: *J. Ind. Hyg. Toxicol.* 21, pp 29; 1939

Grover P.L., Hever A., Sims P.:

Region Epoxides of polycyclic-hydrocarbon-formation and further metabolism of Benz-a-anthracene-5,6-Oxide by human lung. *FEBS Lett.* 34, pp 63-68; 1973

Guernsey D.L., Leuthauser S.W.C.:

Correlation of Thyroid Hormone Dose-dependant Regulation of K-ras Protooncogene Expression with Oncogene Activation by 3-Methylcholanthrene: Loss of Thyroidal Regulation in the Transformed Mouse Cell. *Cancer Research* 47, pp 3052-3056; 1987

Happle R.: *Hautkrankheiten*:

in: *Lehrbuch der Kinderheilkunde*, edits by Schulte F.J., Spranger J., 25. Aufl., Gustav Fischer Verlag, pp 846; 1985

Hanawalt P.C., Cooper P.K., Ganesan A.K., Lyod R.S., Smith C.A. and Zolan M.E.

Repair Responses to DNA Damage: Enzymatic Pathways in *Escherichia coli* and Human Cells. *J. Cell. Biochem.* 18, pp 271-283; 1982

Hanawalt P.C., Friedberg E.C., Fox C.F. (edits.):

DNA Repair Mechanisms. Academic Press, New York; 1978

Hartung J., Elpelt B. und Klösener K.-H.:

Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik,
Oldenburg-Verlag, München Wien; 1982

Hecker E.:

Aktuelle Probleme der Krebsentstehung.

Z. Krebsforsch. 78, pp 99; 1972

Heit M., Klusek L., Baron J.:

Evidence of Deposition of Anthropogenic Pollutants in the
Remote Rocky Mountain Lakes.

Water, Air and Soil Pollution 22, pp 403-416; 1984

Heller S., Fong W.F., Canellaskis E.S.:

Induction of a protein inhibitor to ornithine
decarboxylase by the end products of its reaction.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, pp 1858; 1976

Hilwig I., Gropp A.:

Decondensation of Constitutive Heterochromation in L-Cell
Chromosomes by a Benzimidazole Compound ("33258 Höchst").

Exptl. Cell. Res. 81, pp 474-477; 1983

Höhn-Bentz J., Kurelec B., Zahn R.K.:

Fast ephemeral DNA Damage upon BaP Injection.

The Science of the Total Environ. 32, pp 13-27; 1983

Huberman E., Sachs L.:

Cell-mediated mutagenesis of mammalian cells with chemical
carcinogens. Int. J. Cancer 13, pp 326-335; 1974

Huberman E., Sachs L.:

DNA binding and its relationship to carcinogenesis by
different polycyclic hydrocarbons.

Int. J. Cancer 19, pp 122-127; 1977

Jacob S.T., Rose K.M.:

Stimulation of RNA polymerase I,II and III from rat liver by spermine, and specific inhibition of RNA polymerase I by higher spermine concentrations.

Biochim. Biophys. Acta 425, pp 125; 1976

Jacobsen M., Levin W.W., Poppers P.J., Wood A.W., Conney A.H.:

Comparison of O-Dealkylation of 7-Ethoxycoumarin and Hydroxylation of Benzo(a)pyrene in Human placenta-Effect of Cigarette-Smoking.

Clin. Pharmacol. Therap. 16, pp 701-710; 1974

Kashimoto T., Miyata H., Kunita S., Tung T.C., Hsu S.T., Chang K.J., Tang S.Y., Ohi G., Nakawa J., Yamamoto S.:

Role of polychlorinated dibenzofuran in Yusho (PCB poisoning). Arch. Environ. Health 36, pp 321-326; 1981

Kellermann G., Cantrell E., Shaw C.R.:

Variations in extent of aryl hydrocarbon hydroxylase induction in cultured human lymphocytes.

Cancer Res. 33, pp 1645-1656; 1973

Kellermann G., Luyten-Kellermann M., Shaw C.R.:

Genetic-Variation of aryl Hydrocarbon hydroxylase in human lymphocytes. Am. J. Hum. Genet. 25, pp 327-331; 1973

Kellermann G., Shaw C.R., Luyten-Kellermann M.:

Aryl hydrocarbon Hydroxylase Inducibility and bronchogenic carcinoma. New Eng. J. Med. 289, pp 934-937; 1973

Kezic N., Britvic S., Protic M., Simmons J.E., Rijavec M., Zahn R.K., Kurelec B.:

Activity of Benzo(a)pyrene Monooxygenase in fish from the Sava River, Yugoslavia: Correlation with Pollution.

The Science of the Total Environm. 27, pp 59-69; 1983

Kimbrough R.D., Linder R.E.:

Induction of adenofibrosis and hepatomas of the liver in BALB/CI mice by polychlorinated biphenyls (Arochlor 1254). J.Nutr. Cancer Inst. 53 pp 547; 1974

Kohn K.W., Erickson L.C., Ewing R.A.G., Friedman C.A.:

Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. Biochem. 15, pp 4629-4637; 1976

Kubinsky H., Morin N.R. and Zeldin P.E.:

Increased attachment of nucleic acids to eukaryotic and prokaryotic cells induced by chemical and physical carcinogens and mutagens. Cancer Res. 36, pp 3025-3033; 1976

Kurelec B., Gritvic S., Rijavec M., Müller W.E.G., Zahn R.K.:

Benzo(a)Pyrene monooxygenase induction in marine fish - Molecular response to oil pollution. Mar. Biol. (Berl.) 44, pp 211-216; 1977

Lavin M.F.:

Postreplication Repair in Mammalian Cells after UV Irradiation. Biophys.J. 23, pp 247-256; 1978

Levin W., Wood A.W., Wislocki P.G., Chang R.L., Kapitulnic J., Mah H.D., Yagi H., Jerina D.M., Conntty A.H.:

Mutagenicity and Carcinogenicity of Benzo(a)pyrene and Benzo(a)pyrene-Derivatives, Polycyclic Hydrocarbons and Cancer, Vol 1, pp 189-202, Academic Press New York; 1978

Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.:

Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, pp 265-275; 1951

Manchester D.K., Gordon S.K., Golas C.L., Roberts E.A., Okey A.B.:

Ah-Receptor in Human Placenta: Stabilization by Molybdate and Characterization of Binding 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-dioxin, 3-Methylcholanthrene and Benzo(a)pyrene.

Cancer Research 47, pp 4861-4868; 1987

McCann J. and Ames B.N.:

Detection of Carcinogens as Mutagens in the Salmonella Microsome 'Test: Assay of 300 Chemicals.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, No 12, pp 5135-5139; 1975

McEnroe W.D., Healy S.R.:

Ornithine decarboxylase may function as an initiation factor for RNA polymerase I.

Science 195, pp 505; 1977

Meehan T., Straub K.:

Double-stranded DNA stereoselectively binds benzo(a)pyrene diol epoxides. Nature 227, pp 410-412; 1979

Michaelis J.:

Medizinische Statistik und Informationsverarbeitung.

Georg Thieme Verlag; 1980

Miller E.C., Miller J.A.:

Searches for Ultimate Chemical Carcinogens and Their Reactions with Cellular Macromolecules.

Cancer 47, pp 2327-2345; 1981

Miller J.A.:

Carcinogenesis by chemicals: an overview.

Cancer Res. 30, pp 559-576; 1970

Miranda C.L., Henderson M.C., Wang J.L., Nakaue H.S. and Buhler D.R.:

Effects of polychlorinated biphenyls on porphyrin synthesis and cytochrome P-450-dependent monooxygenases in small intestine and liver of Japanese quail.

J. Toxicol. Environ. Health 20, pp 27-35; 1987

Moll W.L.H.:

Taschenbuch für Umweltschutz IV: Chemikalien in der Umwelt. UTB-Verlag 1987

Mowrer J. et al.: Ambio, pp 355; 1982

Mullin M.D. et al.:

Environ. Sci. Technol. 17,8, pp 449-456; 1983

Nakayama T., Kaneko M., Kodama M., Nagata C.:

Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. Nature 314, pp 462-464; 1985

Nebert D.W., Gelboin H.V.:

Substrate-inducible Microsomal Aryl Hydroxylase in Mammalian Cell Culture

I. Assay and properties of induced enzyme.

J. Biol. Chem. 243, pp 6242-6249; 1968a

Nebert D.W., Gelboin H.V.:

Substr.-indu. Micros. Aryl Hydroxylase in Mamm. Cell Cult.

II. Cellulare responses during enzyme induction.

J. Biol. Chem. 243, pp 6250-6261; 1968b

Nebert D.W., Gelboin H.V.:

The in vivo and in vitro induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cells of different species, tissues, strains and developmental and hormonal states.

Arch. Biochem. Biophys. 134, pp 76-88; 1969

Oesch F.

Bedeutung verschiedener Enzyme in der Kontrolle mutagener und kanzerogener polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe. Hautarzt 28, pp 563; 1977

Oesch F.: Chemical Carcinogenesis by Polycyclic Aromatic Hydr carbons. in: Nicolini C. (edit.), Chemical Carcinogenesis, Plenum Publishing Corp., pp 1-24; 1982

Parodi S., DeFlora S., Cavanna N., Pino A., Robbiano L., Bennialli C., Brambilla G.:

DNA damaging activity in vivo and bacterial mutagenicity of sixteen hydrazine derivatives as quantitatively related with their carcinogenicity.

Cancer Res. 41, pp 1469-1482; 1981

Parodi S., Taningher M., Boero P., Santi L.:

Quantitative correlation amongst alkaline DNA fragmentation, DNA covalent binding, mutagenicity in the Ames test and carcinogenicity for 21 compounds.

Mutation Research 93, pp 1-24; 1982

Payne J.F., Bauld c., Dey A.C., Kiceniuk J.W., Williams U.:

Selectivity of mixed-funktion oxygenase enzym induction in flounder (*Pseudpleuonectes americanus*) collected at the site of Baie Verte, Newfoundland oil spill.

Comp. Biochem. Physiol. 79, pp 15-19; 1984

Pelkonen O., Sotaniemi E., Mokka R.

Chem.-Biol Interactions 16, pp 13-21; 1977

Pott F.: Pyrolyseabgase, PAH und Lungenkrebsrisiko - Daten und Bewertung. Staub-Reinhalt. Luft 45, pp 369-379 (7/8); 1985

Pschyrembel W., Zink C.: Klinisches Wörterbuch, Walter de Gruyter Verlag, 255. Aufl.; 1986

Russell D.H.: Drug stimulation of putrescine and spermidine synthesis. Relationship to enhancement of ribonucleic acid synthesis. *Biochem. Pharmacol.* 20, pp 3481-3484; 1971

Russell D.H.(edit.): Polyamines in Normal and Neoplastic Growth. Raven Press, New York; 1973

Scheller S., Pudelski J., Koziol M., Tustanowski J., Krzywiecki A., Pawlak F., Oklek K., Malinowski T.:
Zur Leistungsfähigkeit einiger Immunmechanismen bei Einwirkung von Verkokungsfaktoren.
Zentralblatt Arbeitsmed., Arbeitsschutz, Prophyl. Ergonomie 32/11, pp 392-396; 1982

Sinex F.M.:

The molecular genetics of aging.
in: *Handbook of Biology of Aging* (Finck L.F., Hauflick L., edits, Van Nostrand Reinhold Cy, New York; 1977

Spranger J.:Klinische Genetik.

in: *Lehrbuch der Kinderheilkunde*, edits by Schulte F.J., Spranger J., 25 Aufl., Gustav Fischer Verlag, pp 157-160; 1985

Stark A.D., Costas K., Chang H.G., Vallet H.L.:

Health effects of low-level exposure to polychlorinated biphenyls.

Environ. Res. 41, pp 174-183; 1986

Stout D.L., Becker F.:

Fluorometric Quantitation of Single Stranded DNA: A Method applicable to the Technique of Alkaline Elution.

Anal.Biochem. 127, pp 302-307; 1982

Stüber J.J., Zahn R.K.:

Biochemical alterations induced in fish by an acute kerosene-spillage.

Arch. Hydrobiol 12, pp 117-127; 1985

Sutherland B.M.:

Photoreactivation. BioScience 31, pp 439-444; 1981

Thielmann H.W.:

Enzymology of DNA Repair.

In: Biochemical Basis of Chemical Carcinogenesis, Greims H., Jung R., Kramer M., Marquardt H., Oesch F. (edits), Raven Press, New York, pp 233-257; 1984

Tong S., Smith J., Manson D., Gorrod J.W. and Ionnides C.:

The metabolic activation of 2-naphthylamine to mutagens in the Ames test.

Anticancer Res. 6, pp 1107-1112; 1986

Trell L., Janzon L., Korsgaard R., Laurell P., Trell E.:

Smoking, carboxyhaemoglobin, carbon monoxide in expired air and inducibility. A cross-sectional study and anti-smoking applications in middle-aged man.

Anticancer Res. 4, pp 347-350; 1984

Umweltbundesamt-Berichte 1/1979:

Luftqualitätskriterien für ausgewählte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe.

Erich Schmidt Verlag, Berlin, pp 229; 1979

Unger M., Olsen J., Clausen J:

Organochlorine compounds in the adipose tissue of deceased persons with and without cancer: A statistical survey of some potential confounders.

Environ. Res. 29, pp371-376; 1982

Wassermann M., Ron M., Bercovici B., Wassermann D., Cucos S., Pines A.:

Premature delivery and organochlorine compounds: Polychlorinated biphenyls and some organochlorinated insecticides. Environ. Res. 28, pp 106-112; 1982

Witkin E.M

Thermal Enhancement of UV Mutability in a *tif-luvrA* Derivative of *Escherichia coli* B/R: Evidence that Mutagenesis depends upon Inducible Function.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, pp 1930-1934; 1974

Yakushiji T., Watanabe I., Kuvabara K., Tanaka R., Kashimoto T., Kunita N., Hara I.:

Rate of Decrease and Half-Life of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in the Blood of Mothers and Their Children occupationally.

Arch. of Environ. Contamination and Toxicology 13, pp 341-345; 1984

Yang K.S., Deutsch J., Gelboin H.V.:

Benzo(a)pyrene metabolism: activation and detoxification. in: Gelboin H.V., Ts'ao, P.O.(eds.), Polycyclic Hydrocarbons and Cancer, vol. 1, Academic Press, New York, pp 205-232; 1978

Yang K.S., McCourt D.W., Leutz J.L., Gelboin H.V.:

Benzo(a)pyrene diol-epoxide: mechanisms of enzymatic formation and optically active intermediates.

Science 196, pp 1199-1201; 1977

Yoshimuro T. et al.:

Environ. Res. 17, pp 416- 425; 1978

Zahn R.K.:

Measurement of molecular weight distributions in human muscular DNA.

Mech. Ageing Develop. 22, pp 355-379; 1983

Zahn R.K.:

Über physikalische Umweltrisiken.

Akad. d. Wiss. u. d. Literatur, Mainz, Franz Steiner Verlag Wiesbaden GmbH, Stuttgart; 1985

Zahn R.K., Kurelec B., Zahn-Daimler G., Müller W.E.G.,
Rijavec M., Batel R., Given R., Pondeljak V.; Beyer R.:

The Effect of Benzo(a)pyrene on Sponges as Model Organisms
in Marine Pollution.

Chem. Biol. Interactions 39, pp 205-220; 1982

Zahn R.K., Stüber J.J., Reitz M., Emmig C., Jannek U.,
Kurelec B.:

The Interplay between Mixed functions Oxygenases and DNA
Alteration under PAH Pollution.

Marine environ. Res. 17, pp 317-319; 1985

8. Lebenslauf

Name : Dorothea Reichert geb. Becker

geboren am : 04. Juli 1963 in Dinslaken

Heirat : 22.04.1988 mit Willi Reichert,
Steuerberater, vereidigter Buchprüfer

Eltern : Dieter Becker, Dipl. Ing. für
Maschinenbau
Regina Becker geb. Sauer,
Industriekaufmann

Bildungsweg : 1969 - 1973
Grundschule Neunkirchen-Wellesweiler

1973 - 1982
Gymnasium am Steinwald, Neunkirchen

1982 Abitur

Wintersemester 1982/83
Studium der Elektrotechnik an der
Universität Saarbrücken

Sommersemester 1983 - Wintersemester
1987/88 Studium der Medizin an der
Johannes-Gutenberg-Universität,
Mainz

1985 - 1988 Experimenteller Teil der
Promotionsarbeit in der Biochemie

Mai 1988 - Mai 1989

Ableistung des "Praktischen Jahres"
an den Städtischen Kliniken
Ludwigshafen

08. Mai 1989 3. medizinisches
Staatsexamen

seit 1. September "Arzt im Praktikum"
im Kreiskrankenhaus Bad Bergzabern
-Innere Abteilung-

Lustadt, den

9. März 1990

9. D a n k s a g u n g

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. R. K. Zahn, Mainz, danke ich für die freie Überlassung des Themas, für die umfassende Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und für zahlreiche Diskussionen und Anregungen, die auch meine persönliche Weiterentwicklung prägten.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. B. Schmidt, Mainz, für die Erstellung des Gutachtens und für zahlreiche anregende Gespräche während der Durchführung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Jürgen Stüber danke ich für die enge Zusammenarbeit, für viele Ratschläge und Hilfestellungen.

Herrn R. Beyer, Mainz, danke ich für die Einführung in experimentelles Arbeiten und viele Anregungen bei der täglichen Arbeit.

